UNIVERSITE PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE : **Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé**

Laboratoire : **Inserm U612 (Génotoxicologie, Signalisation et Radiothérapie Expérimentale) – Institut Curie**

DISCIPLINE : **Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire**

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue publiquement le 14 Décembre 2011

par

Mohammed-Tayyib BOUDRA

Facteurs modulant la radiosensibilité : Rôle des protéines PARP-1, PARP-2 et Cdk5 et implication de la chromatine.

Directeur de thèse :	**Dr. Janet HALL**
Co-directeur de thèse :	**Dr. Frédérique MEGNIN-CHANET**

<u>Composition du jury</u> :

Président du jury :	Dr. Joëlle WIELS
Rapporteurs :	Dr. Valérie SCHREIBER
	Dr. J. Pablo RADICELLA (Absent)
Examinateurs :	Dr. Danièle PRASEUTH
	Dr. Vincent FAVAUDON
Directeur de thèse :	Dr. Janet HALL
Co-directeur de thèse :	Dr. Frédérique MEGNIN-CHANET

A mon frère Issa…

Remerciements…

…

…

…

Sommaire

Liste des abréviations 6

Contexte et objectifs 10

Introduction Générale 14

I. Les dommages à l'ADN et leurs origines 15
1. Dommages spontanés provenant de sources endogènes 15
2. Dommages induits par des sources exogènes 16
2.1. Dommages induits par des agents chimiques 16
2.2. Dommages induits par des rayonnements ultraviolets 17
2.3. Dommages induits par des rayonnements ionisants 18

II. Les rayonnements ionisants 20
1. Les différents rayonnements utilisés 20
1.1. Rayonnement « non ionisant » : le laser à 405 nm 21
1.2. Rayonnement électromagnétique γ 23
2. Les effets chimiques et biologiques des rayonnements ionisants 23
2.1. Les effets chimiques, directs et indirects, des rayonnements ionisants 24
2.2.1. Les dommages de bases (DB) 26
2.2.2. Les cassures simple-brin (CSBs) 27
2.2.3. Les cassures double-brin (CDBs) 28
2.2.4. Les pontages de l'ADN 28
2.2.5. Les dommages multiples localisés (LMDS) 29
2.3. Les effets des rayonnements ionisants sur la chromatine 29
2.4. Les effets des rayonnements ionisants au niveau cellulaire 30

III. Les différentes voies de réparation des dommages de l'ADN 32
1. Voies de réparation des dommages de bases (BER) et des cassures simple brins (SSBR) 34
1.1. Détection des bases endommagées lors du BER (*Base Excision Repair*) 35
1.2. Détection des cassures simple brins dans le SSBR (*Single Strand Break Repair*) 37
1.3. Rôle de coordination par XRCC1 lors du BER et du SSBR 38
1.4. Les étapes communes du BER et du SSBR 39
1.4.1. Traitement des extrémités des CSBs 39
1.4.2. Remplissage et ligation de la brèche 41
1.4.3. Ligation de l'ADN 42
2. Les autres voies de réparation des dommages de l'ADN 43
2.1. Voie de réparation par excision de nucléotide (NER) 44
2.1.1. La réparation globale du génome (GGR) 45

2.1.2. La réparation couplée à la transcription (TCR) 46
2.2. Voie de réparation des mésappariements de bases (MMR : *Mismatch Repair*)……..46
2.3. Voies de réparation des cassures doubles brins 48
2.3.1. Voie de réparation par recombinaison homologue (HR) 48
2.3.2. Voie de réparation par Single-Strand Annealing (SSA) 50
2.3.3. Voie de réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) 51
2.3.3.1. Le C-NHEJ 52
2.3.3.2. Le A-NHEJ 53

IV. Modifications post-traductionnelles des protéines 55
1. La poly(ADP-ribose)ylation. 55
1.1. Les poly(ADP-riboses)polymérases (PARPs) 56
1.1.1. La poly(ADP-ribose)polymérase 1 (PARP-1) 59
1.1.1.1. Structure et fonctions de PARP-1 60
1.1.1.2. Rôles de PARP-1 dans la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN 62
1.1.2. La poly(ADP-ribose)polymérase 2 (PARP-2) 64
1.1.2.1. Structure et fonctions de PARP-2 64
1.1.2.2. Rôles de PARP-2 dans la réparation des dommages de l'ADN 66
1.1.3. La poly(ADP-ribose)polymérase 3 (PARP-3) 67
1.1.3.1. Structure et fonction de PARP-3 67
1.1.3.2. Rôles de PARP-3 dans la réparation des dommages de l'ADN 68
1.2. Les inhibiteurs d'activité PARP 68
1.2.1. Structures et principe d'action des inhibiteurs de PARP 68
1.2.2. Applications thérapeutique des inhibiteurs de PARP 70
1.3. Le catabolisme des poly(ADP-ribose) 75
1.3.1. La poly(ADP-ribose) Glycohydrolase (PARG) 75
1.3.2. Rôle de PARG dans le maintien de l'intégrité du génome 76
1.4. La poly(ADP-ribose)ylation et la chromatine 77
2. La phosphorylation 82
2.1. Le rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'activité PARP 82
2.2. La kinase dépendante des cyclines 5 (Cdk5) 85
2.2.1. Découverte, structure et localisation de Cdk5 85
2.2.2. Activation et régulation d'activité de la Cdk5 86
2.2.2.1. Les activateurs de Cdk5 : 86
2.2.2.2. Régulation de l'activité kinase de Cdk5 : 87
2.2.3. Les fonctions de Cdk5 dans et en dehors des neurones 88
2.2.4. Le rôle de Cdk5 dans la réponse aux dommages de l'ADN 90
2.2.5. Le rôle de Cdk5 au niveau de la chromatine 91

Résultats et Discussions 93

1ère partie : Impact de la déplétion deCdk5 sur l'activité poly(ADP-ribose)polymérase et la réponse aux radiations 94

I. Introduction. 95
II. Résultats 97
Article n° 1: The impact of Cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP ribose) polymerase activity and responses to radiation 97
III. Discussion - Conclusions 113

2ème Partie : Impact de l'inhibition de l'activité PARP et/ou de la déplétion de PARP-1 et PARP-2 sur le recrutement des facteurs du BER et du SSBR après photo-dommages 116

I. Introduction 117
II. Résultats 119
1. Article n° 2 : PARP-2 modulates PARP-1, XRCC1 and PCNA recruitment to DNA damage sites via the modification of PARG activity. 119
2. Résultats complémentaires 143
2.2. Effet de l'inhibition de PARPs sur la radiosensibilité des cellules HeLa Contrôles, PARP-1^{KD}, PARP-2^{KD} et Ligase-1^{KD} 144
2.3. Impact de l'inhibition des PARPs et de la déplétion de la Ligase I sur le SSBR..... 145
III. Discussion - Conclusions 147

3ème partie : L'impact d'inhibition d'activité PARP et de déplétion de PARP-1, PARP-2, PARG ou Cdk5 sur les cinétiques de recrutement des facteurs de remodelage de la chromatine ALC1 et CAF1 au site du photo-dommage.. 151

I. Introduction 152
II. Résultats 154
1. L'impact d'inhibition de PARP ou de déplétion de PARP-1, PARP-2, PARG ou Cdk5 sur la cinétique de recrutement d'ALC1 au site du dommage d'ADN. 154
2. Impact de la déplétion de PARP-1 sur la cinétique de recrutement de CAF1 au site du dommage d'ADN. 158
III. Discussion - Conclusions 159

Conclusion générale et Perspectives 162

Bibliographie 169

Annexes 209

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ALC1	Amplified in Liver Cancer 1
AMD	Auto-Modification Domain
AMP-K	AMP-activated protein Kinase
ANI	4-amino-1,8-naphthalimide
AOA	Aprataxie Ataxie Oculomotrice
AP	site abasique (apurique/apyrimidique)
APLF	Aprataxin- and PNK-Like Factor
ARH3	ADP-ribosilarginine hydrolase 3
ARN	Acide Ribonucléique
AT	Ataxia Telangiectasia
ATM	Ataxia Telangectasia Mutated
ATR	ATM and rad3 Related
BER	Base Excision Repair
BLM	Bloom
A-NHEJ	Alternative-NHEJ
BRCT	BRCA1 C-terminal domain
BrdU	Bromodésoxyuridine
C-Abl	c-Abelson
CAF1	Chromatin Assembly Factor 1
CDB	Cassure Double-Brin
Cdk5	Cyclin-Dependent Kinase 5 (kinase dépendante des cyclines 5)
CENPA	centromere protein A
CENPB	centromere protein B
CHK2	Checkpoint 2 kinase
CHO	Chinese Hamster Ovary
CK2	Caséine Kinase 2
CKI	Cyclin Kinase Inhibitor
CPD	dimères de pyrimidine cyclobutane
CPT	Campthothécine

CSA	Cockayne Syndrome Protein A
CSB	Cassure Simple-Brin
CSB	Cockayne Syndrome Protein B
DAR	transcription Domain-Associated Repair
DB	Dommages de Bases
DBD	DNA Binding Domain
DDB	Damaged DNA Binding protein
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
DNA-PKcs	DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit
dRP	désoxyribose phosphate
e_{aq}	électron hydraté
EC50	50 % Effective Concentration
Erk-1	Extracellular signal-regulated kinases 1
Erk-2	Extracellular signal-regulated kinases 2
EXO1	Exonucléase 1
FACT	Facilitates Chromatin Transcription
FEN1	Flap Endonucléase 1
GGR	Global Genomic Repair
HDAC1	Histone désacétylase 1
HeLa	Henrietta Lacks cells
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HMGP	High Mobility Group Proteins
hMLH1	human MutL homologous mismatch repair protein 1
hMSH	human MutS Homologous protein
HP1	heterochromatin protein 1
hPARP-3	human PARP-3
HR	Homologous Recombination
IC50	50 % Inibitory concentration
IdU	Iododéoxyuridine
ILK	Integrin-Linked Kinase

JNK1	c-Jun-N-terminal kinase I
KO	Knock Out
LPR	Long-Patch Repair
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBT	Malignant Brain Tumor
MEFs	Mouse Embryonic fibroblast
MGMT	O^6-methylguanine DNA-methyltransferases
MMR	Mismatch repair
MMS	Méthyle Méthane-Sulfonate
MNNG	N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MNU	N-méthyle-N'-nitroso-urée
MRC	Multiprotein DNA Replication Complex
MS	Mass Spectrometry
Nam	Nicotinamide
NBS	Nigmegen Breakage Syndrome
NCK5	Neuronal Cdk5 activator
NCK5ai	Neuronal Cdk5 activator isoform
NCS	Néocarzinostatine
NEIL	Endonucléases VIII-Like
NHEJ	Non Homologous End-Joining
NoLS	Nucleolar Localisation Signal
NTH1	Endonuclease III homologue
OGG1	8-oxoguanine-DNA glycosylase
PAR	poly(ADP-ribose)
PARG	poly(ADP-ribose) glycohydrolase
PARP-1	poly(ADP-ribose) polymerase 1
PARPs	poly(ADP-riboses) polymerases
PBD	Protein Binding Domain
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
pEBV	Epstein-Bar Virus

PMS2	postmeiotic segregation increased 2
PNK	Polynucleotide Kinase
Polβ	polymérase β
RFC	Replication Factor C
RI	Radiation Ionisante
RNS	espèces réactives de l'azote
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RPA	Replication Protein A
SCE	Sister Chromatid Exchange
shRNA	short hairpin RNA
SIR2	silent information repressor protein-2
SNPs	polymorphismes nucléotidiques
SPR	Short-Patch Repair
SSA	Single Strand Annealing
SSBR	Single Strand Break Repair
TCR	Transcription-Coupled Repair
TDP1	Tyrosyl phosphodiesterase 1
TEL	Transfert d'Energie Linéique
TMZ	Témozolomide
TRF2	Telomeric Repeat binding factor 2
TT	Thymines contiguës
UNG	Uracil-ADN glycosylase
UV	ultraviolet
XP	Xeroderma Pigmentosum
XRCC1	X-Ray Cross Complementing protein 1

Contexte et objectifs

En France, de plus en plus de personnes contractent un cancer et cette maladie est la première cause de décès avant l'âge de 65 ans. En 2010, le nombre de nouveaux cas de cancers diagnostiqués a atteint 357 500 personnes (203 000 chez les hommes et 154 500 chez les femmes). Ce nombre représente une augmentation d'environ 65% en vingt ans. Dans la même période, le nombre de décès dus au cancer n'a augmenté que de 20%, passant d'environ 125 000 à environ 150 000 par an. Ce progrès témoigne d'une amélioration du dépistage, des traitements et de la prise en charge des patients. Il reste que les cancers sont responsables de 27% des décès et constituent depuis l'année 1989 la première cause de mortalité masculine et la deuxième pour les femmes. Il est donc capital d'encourager des recherches fondamentales pour mieux comprendre les mécanismes de la cancérogenèse et la réponse des tumeurs aux traitements en vue de cibler spécifiquement les cellules tumorales tout en épargnant le mieux possible les tissus sains, et améliorer ainsi les thérapies anticancéreuses.

Le traitement des cancers est basé sur trois grands moyens thérapeutiques : la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Cette dernière utilise les radiations ionisantes (RI) pour tuer les cellules tumorales tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants. Plus de la moitié des patients atteints d'un cancer sont traités par radiothérapie à une étape de leur parcours de soin. La radiothérapie est donc un outil thérapeutique essentiel dans le traitement des cancers. La radiothérapie a fait des progrès considérables au cours des deux dernières décennies. Ces progrès sont venus, pour l'essentiel, de l'imagerie, des accélérateurs linéaires et de l'informatique. L'association de la chimiothérapie à la radiothérapie a également joué un rôle majeur, les associations chimio- radio-thérapeutiques constituent aujourd'hui le traitement de référence dans un grand nombre de localisations. Ces combinaisons ont été très étudiées à partir de la fin des années 1980. Quelques unes, ayant fait preuve de leur efficacité et d'une tolérance acceptable, sont aujourd'hui entrées dans la pratique quotidienne (55), tandis que les traitements combinés avec des agents thérapeutiques ciblés font l'objet de nombreux essais cliniques (152).

L'efficacité de la radiothérapie dépend de la radiosensibilité des tumeurs ainsi que du volume irradié et de l'environnement tumoral. Une meilleure connaissance des mécanismes qui contrôlent la réponse cellulaire et tissulaire aux rayonnements ionisants est d'un intérêt majeur pour l'amélioration du contrôle tumoral et de la réduction des complications. La recherche et la caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques participe au premier chef à cet objectif. L'équipe de l'unité 612 Inserm a développé un axe de recherche visant à la compréhension de ces mécanismes en s'intéressant en particulier à l'implication de la réparation de l'ADN, plus spécifiquement la réparation des dommages de bases (BER) et des

cassures simples brin de l'ADN (SSBR), dans le contrôle de la radiosensibilité des cellules tumorales.

On sait que l'invalidation du gène codant la poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1), une protéine impliquée dans la détection et la réparation des cassures simples-brin de l'ADN, présentent une hyper-radiosensibilité aussi bien dans les cellules murines (110,374,375) que dans les cellules humaines (179). Cependant on ignorait l'impact de la déplétion d'une autre protéine de cette famille, PARP-2, impliquée également dans la détection et la réparation des lésions de l'ADN, sur la radiosensibilité des cellules humaines. De plus, l'équipe venait de démontrer que l'hyper-radiosensibilité des cellules déficientes pour PARP-1 ne pouvait s'expliquer par le seul rôle de PARP-1 dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN (179). PARP-1, grâce à son activité de poly(ADP-ribosyl)ation des histones, permet la relaxation de la chromatine et facilite ainsi l'accès des protéines de la réparation aux sites de dommages. Les mécanismes par lesquels les polymères d'ADP-ribose (synthétisés par PARP-1 et 2 et dégradés par la protéine poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)) modulent la chromatine pendant la réparation ne sont pas encore clairs, ni qu'elle est la contribution de PARP-2 dans ces processus.

D'autre part, le travail d'Ashworth et ses collaborateurs (508) a montré que l'inhibition par siRNA de la protéine kinase dépendante des cyclines 5 (Cdk5) sensibilise les cellules aux inhibiteurs de PARP. De plus les cellules dépourvues de Cdk5 induisent une formation spontanée de cassures double-brin qui sont réparées avec les mêmes cinétiques que les cellules contrôles (508). Ces données nous ont conduit à poser les questions suivantes : cette sensibilité aux inhibiteurs de PARPs provient-elle d'un défaut dans d'autres mécanismes de réparation que ceux des cassures double-brin ? Les mécanismes de BER et des SSBR sont-ils impliqués ?

Le sujet de thèse qui m'a été proposé partait de ces observations. Ainsi, j'avais pour objectifs :

i) la caractérisation du rôle de Cdk5 dans la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN radio-induits ainsi que dans la radiosensibilité et l'identification des mécanismes moléculaires sous-jacents;

ii) l'étude du rôle précis de PARP-2 dans les voies de réparation BER et SSBR, et de l'effet de sa déplétion sur la radiosensibilité des cellules humaines HeLa ;

et iii) l'étude de l'impact de la déficience de PARP-1, PARP-2, PARG ou Cdk5 sur les mécanismes de recrutement de certains facteurs chromatiniens. Notre choix s'est initialement porté sur le facteur CAF1 (*Chromatin Assembly Factor 1*), facteur impliqué dans la formation

des nucléosomes au cours de la réplication et qui joue également un rôle dans la réparation des lésions induites par les UV-C (185,412). Sa relation avec PARP1 et PARP-2 reste inconnue. Au cours de ma thèse, un nouveau facteur chromatinien, ALC1 (*Amplified in Liver Cancer 1*) a été identifié comme étant ADP-ribosylé en réponse aux dommages de l'ADN (3). L'activité d'ALC1 est fortement activée par la PARP-1 (183), cependant son éventuelle relation avec PARP-2 n'est pas connue.

Introduction Générale

I. Les dommages de l'ADN et leurs origines

La constitution physicochimique de l'ADN ne garantit pas sa stabilité tout au long de la vie cellulaire. Ce matériel génétique nucléique subit des milliers d'altérations par cellules et par jour. Toute altération constitue un dommage à l'ADN et peut prendre des formes multiples dont les plus connues sont : les pertes de bases, les dommages de bases, les cassures simple-brin (CSBs), les cassures double-brin (CDBs), les pontages ADN/ADN et les pontages ADN/protéine.

Les origines des dommages à l'ADN sont multiples, provenant de sources endogènes comme les espèces oxygénées réactives produites par le métabolisme cellulaire, et par des expositions exogènes telles que des agents environnementaux, chimiques ou physiques comme les ultraviolets (UV) et les rayonnements ionisants.

1. Dommages spontanés provenant de sources endogènes

La majorité des altérations touchant à l'ADN génomique sont des lésions spontanées qui sont principalement la conséquence de l'activité métabolique normale des cellules en présence d'oxygène. En effet, le métabolisme oxydatif dans les mitochondries, et la peroxydation des lipides génèrent des radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène (ROS) : radicaux hydroxyles, péroxyde d'hydrogène, anion superoxyde), dont environ 2% échappe aux systèmes enzymatiques anti-radicalaires et antioxydants, et sont à l'origine par réactions chimiques de la plupart des dommages spontanés de l'ADN. Ces radicaux libres induisent la désamination spontanée des bases transformant l'adénine en hypo-xanthine, la guanine en xanthine, la cytosine en uracile et la 5Me-cytosine en thymine et entraînent une altération de l'information codante.

Globalement, les modifications de bases représentent environ 10 000 dommages de bases par cellule et par jour (dont environ 200 désaminations de la cytosine), plus de 1000 oxydations de bases (le niveau de 8-oxoguanine seul formé de façon spontanée dans le génome des lymphocytes humaines est d'environ 1500), et des méthylations accidentelles de bases, aboutissant par exemple à environ 3000 méthylations de la guanine (la N7-méthylguanine) ou 4000 méthylations de l'adénine (la N3-méthyladénine) (56,529). De plus, le métabolisme oxydatif induit chaque jour au niveau de l'ADN cellulaire un très grand nombre de CSBs≈(55 000), quelques CDBs (≈ 8) et quelques liaisons ADN/ADN et ADN/Protéine (56,529). Les radicaux oxygénés peuvent également provoquer l'hydrolyse de

nucléotides et des pertes de bases par dépurination (≈ 2000 par cellule par jour) et dépyrimidination (≈ 600 par cellule par jour) générant des sites abasiques (302).

Parmi les dommages spontanés de l'ADN se trouvent également les erreurs de réplication à l'origine de mésappariements entre les deux brins d'ADN. Les RNA polymérases peuvent aussi être à l'origine d'erreurs de transcription mais ces erreurs à long terme ont certainement moins d'effets mutagènes que les erreurs de réplication. Enfin, il peut se produire une oxidation du pool des nucléotides. Par exemple, les dGTP peuvent être convertis en 8-OHdGTP qui après incorporation dans l'ADN entraînent des mésappariements (468).

2. Dommages induits par des sources exogènes

Les dommages induits au niveau de l'ADN peuvent provenir de plusieurs sources exogenes :

- par des agents chimiques, environnementaux comme par exemple l'arsenic contenu dans les eaux de boisson, industriels comme certains colorants et peintures ou médicaux comme un grand nombre d'agents anticancéreux.
- par les rayonnements ultraviolets naturels ou commerciaux
- par les radiations ionisantes, soit d'origine naturelle telle que l'exposition au radon ou médicales telle que la radiothérapie.

2.1. Dommages induits par des agents chimiques

Plusieurs agents chimiques induisent différents types de dommages de l'ADN :

- Les Agent alkylants, comme le MMS (Méthyle Méthane-Sulfonate), le MNNG (N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) et le MNU (N-méthyle-N'-nitroso-urée), ainsi que ceux utilisés en cancérologie comme le témozolomide (TMZ), induisent par alkylation différents dommages de bases telle que par exemple la O^6-méthylguanine, lésion de l'ADN hautement mutagène (133).

- Les Intercalants, comme le psoralène, et les agents de pontages, tels que les moutardes à l'azote et le cis-platine, induisent des mono-adduits et des pontages entre brins de l'ADN. En plus des pontages inter-brins, le cis-platine induit également des liaisons intra-brins et des liaisons ADN/protéines (pour des revues récentes voir (112)).

- Les amines aromatiques, les hydrocarbures polycycliques aromatiques et les aflatoxines forment des adduits volumineux dans l'ADN. Certains de ces agents ont besoin d'être au

préalable métabolisés (par les cytochromes P450 par exemple), pour produire des espèces réactives capables d'interagir avec les bases de l'ADN (voir revue (225)).

- Certains agents chimiques induisent des CDBs tels que les poisons de topoisomérases I et II et certaines antibiotiques comme la bléomycine et la néocarzinostatine (NCS). La néocarzinostatine (NCS), utilisée comme inducteur de CDBs au cours de ma thèse, est le prototype des "protéines antibiotiques" sécrétées par des bactéries du genre *Streptomyces* (150). La NCS est un complexe formé d'un chromophore (NCS_{Chrom}) qui constitue le principe actif et présente une forte affinité pour le petit sillon de l'ADN, lié réversiblement à une petite protéine, l'apoprotéine (apo-NCS, m=10,7 kDa) assurant son transport et protégeant le chromophore de l'hydrolyse. La structure chimique particulière du NCS_{Chrom} contient un cycle ène-dodécadiyne qui se réorganise après réduction pour former une structure tricyclique "biradicalaire" labile et hautement réactive. Cette réaction, lorsqu'elle se produit au sein du complexe ADN-NCS_{Chrom}, aboutit à la formation d'une cassure simple-brin sur l'un des brins de l'ADN, avec libération d'un résidu thymidine-5'-aldéhyde, et d'un site AP oxydé sur le brin complémentaire (149,151). Ce site AP est substrat pour les AP-endonucléases, de sorte que dans les cellules exposées à l'action de la NCS, l'action des AP-endonucléases aboutit en quelques fractions de seconde à une cassure double-brin non cohésive. L'utilisation de mutants défectifs dans diverses voies de réparation a confirmé que l'effet létal de la NCS *in vivo* procède exclusivement de cassures double-brin de l'ADN.

2.2. Dommages induits par des rayonnements ultraviolets

Les rayons ultraviolets induisent également des dommages au niveau de l'ADN. Le spectre UV est composé d'UVC (100 à 280 nm), d'UVB (280 à 320 nm) et d'UVA (320 à 400 nm). Les UVC et les UVB de longueurs d'onde inférieurs à 295 nm sont filtrés par la couche d'ozone avant qu'ils n'atteignent la surface de la terre. Seuls les UVB de longueurs d'onde supérieurs à 295 nm et les UVA atteignent la terre (220).

Après exposition aux rayons UV solaires, plusieurs photoproduits sont formés dans l'ADN cellulaire dont le nombre dépend principalement de la longueur d'onde des rayons reçus (220). Contrairement aux UVB, les UVA sont faiblement absorbés par l'ADN et les dommages détectés ont lieu indirectement par l'intermédiaire de photosensibilisateurs tels que les mélanines endogènes et les protéines à porphyrine, à hème ou contenant des groupements flavines. Les photosensibilisateurs peuvent également être exogènes comme des agents antibactériens tels que l'acide naladixique et les fluoroquinolones ou comme

l'immunosuppresseur azathioprine (pour revue voir (429)). En photochimiothérapie, le 8-methoxypsoralène (methoxsalen) par exemple est utilisé en association avec les UVA (PUVA) pour provoquer des dommages dans l'ADN qui sont utilisés dans le traitement du psoriasis (172). Ces photosensibilisateurs exogènes absorbent les UVA et libèrent des ROS qui sont à l'origine des dommages de l'ADN induits par les UVA. En plus de la libération des ROS, des espèces réactives de l'azote (RNS) tels que l'acide nitrique et le péroxynitrite se forment après exposition aux UVA et peuvent modifier la structure de l'ADN (337).

Parmi les dommages de l'ADN induits par les UV, on peut citer également les dimères de pyrimidine cyclobutane et les photoproduits pyrimidine-6-4-pyrimidone (425). La plupart des dimères de pyrimidine implique des thymines contiguës (TT) mais, selon la longueur d'onde, la dose et les séquences adjacentes, des dimères TC, CT ou CC peuvent également se former. Pendant de nombreuses années, on a considéré que ces lésions étaient formées exclusivement après exposition aux UVB mais des études récentes ont montré que ce n'était pas le cas et que des dimères de pyrimidine cyclobutane (CPD) ont été détectées après exposition aux UVA sur plusieurs modèles cellulaires (tel que les cellules CHO) et plus récemment sur un modèle de peau humaine (pour revue, voir (429)).

Les dimères de pyrimidines ont comme conséquence la distorsion de la double hélice d'ADN dont l'appariement des bases est conservé. Les pyrimidines-pyrimidones impliquent préférentiellement des TC, CC et TT et sont formés avec un taux correspondant à environ 30% de celui des dimères de pyrimidines. Les pyrimidines-pyrimidones induisent une distorsion plus prononcée de l'ADN avec une perte de l'appariement des bases au site du dommage.

Les rayonnements UV induisent aussi des modifications de bases et des hydratations de pyrimidines. Les hydratations de bases pyrimidiques sont mutagènes. C'est le cas de l'hydrate de cytosine, par exemple, qui est lu par l'ADN polymérase comme un uracile ou une thymine. Les UV peuvent également provoquer des lésions oxydatives formant des CSBs, des CDBs et des liaisons ADN/protéine (425).

2.3. Dommages induits par des rayonnements ionisants

L'effet délétère des rayonnements ionisants est dû à l'interaction directe des énergies des radiations avec l'ADN, et/ou l'interaction de ces énergies avec les molécules d'eau qui vont après radiolyse, réagir *via* les ROS avec la molécule d'ADN. Les ROS produits par la

radiolyse de l'eau après irradiation ajoutent un stress oxydatif supplémentaire dans les cellules. En effet, une dose de 1 Gy d'irradiation par rayons X ou γ provoque environ 40 CDBs par cellule diploïde, soit cinq fois plus que le nombre de CDBs formées spontanément par jour dans chaque cellule. Il faut toutefois noter que les CDB radio-induites sont produites au hasard dans l'ensemble de la chromatine, alors que les CDB produites spontanément se trouvent en général au niveau des fourches de réplication, où elles sont susceptibles d'être intégralement réparées par recombinaison homologue. En définitive, le nombre très élevé et la grande variété de lésions provoquées par les RI font d'elles un agent physique cytotoxique largement utilisé en cancérologie et ont été de ce fait bien étudiées.

Le chapitre suivant montre en détail les différents rayonnements utilisés dans cette étude, leurs effets chimiques sur l'ADN (les différents types de lésions induites par RI au niveau de l'ADN) et par conséquences leur effets sur la chromatine, et leurs effets biologique sur les cellules.

II. Les rayonnements ionisants

1. Les différents rayonnements utilisés

On appelle rayonnement ou radiation les processus d'émission ou de transmission d'énergie sous la forme d'ondes électromagnétiques ou de particules.
Un rayonnement peut être ionisant ou non ionisant. Il est dit ionisant lorsqu'il est susceptible d'arracher des électrons à la matière. Pour cela, il est nécessaire que l'énergie individuelle des particules ou des photons mise en jeu soit supérieure à l'énergie de liaison minimale des électrons du milieu considéré.
On peut donc classer les rayonnements en :

- Rayonnements non ionisants :
  - rayonnements électromagnétiques dont la longueur d'onde est supérieure à 100 nm. C'est le cas des ondes radio, des UV, de la lumière visible, des infrarouges et des micro-ondes.
- Rayonnements ionisants (RI):
  - Rayonnements électromagnétiques dont la longueur d'onde est inférieure à 100 nm. C'est le cas des photons X et γ
  - Particules non chargées (neutrons).
  - Leptons : électrons (β^-) et positrons (β^+).
  - Ions chargés (particules α, protons, ions carbone, etc...).

Les particules chargées sont dites « directement ionisantes » car elles arrachent des électrons à la matière dans laquelle elles se propagent ; ces particules chargées sont entourées d'un champ électrique qui permet, lors des chocs, une ionisation directe.

L'interaction des rayonnements avec la matière est caractérisée par leur libre parcours moyen et leur transfert d'énergie linéique (TEL). Le TEL est la densité d'énergie absorbée par le milieu rapportée à l'unité de longueur de la trajectoire de la particule ionisante dans ce même milieu. Pratiquement, le TEL est exprimé en keV/µm et l'énergie déposée par le rayonnement dans la matière est exprimée en Gray (Gy) dont 1 Gy = 1 Joule/kg.

Au cours de ma thèse, j'ai pu utiliser comme sources de dommages à l'ADN un rayonnement « non ionisant » (faisceau laser à 405 nm) et un rayonnement ionisant (rayonnement γ).

1.1. Rayonnement « non ionisant » : le laser à 405 nm

Ces dernières années, la recherche autour de la réparation des lésions de l'ADN a été largement ranimée par le suivi en temps réel de protéines ou facteurs de la réparation marqués à la GFP, grâce au développement de différentes méthodes couplées à la vidéo-microscopie permettant des dommages très localisés dans les cellules vivantes. Ainsi, les cinétiques de certains facteurs de réparation par Excision de Nucléotide (NER) ont pu être déterminées par microscopie après irradiation des cellules par des rayons UV-C à travers un filtre polycarbonate (211,357,556). En parallèle, des méthodes alternatives ont été développées grâce à l'utilisation de rayons laser focalisés qui induisent des dommages de l'ADN très localisés dans des régions du noyau choisies par l'utilisateur. Cette approche permet une grande flexibilité aussi bien dans le choix de la région à irradier que par la taille et la forme du spot responsable des dommages et est largement utilisée depuis une dizaine d'années (43,179,273,341,362,363).

En 2009 Kong et al. (261) avaient rmontré que l'induction des dommages de l'ADN par laser est déterminée selon le type du laser par trois mécanismes physiques : l'absorption monophotonique, l'absorption biphotonique et la formation d'un plasma ; les effets photochimique, thermique, et mécanique qui en résultent aboutissent à la formation de radicaux ou de particules (figure 1). L'induction des dommages de l'ADN, le nombre et le type des dommages induits dépend non seulement de la longueur d'onde utilisée mais aussi de la durée et de la fréquence de l'impulsion, et de l'énergie totale déposée.

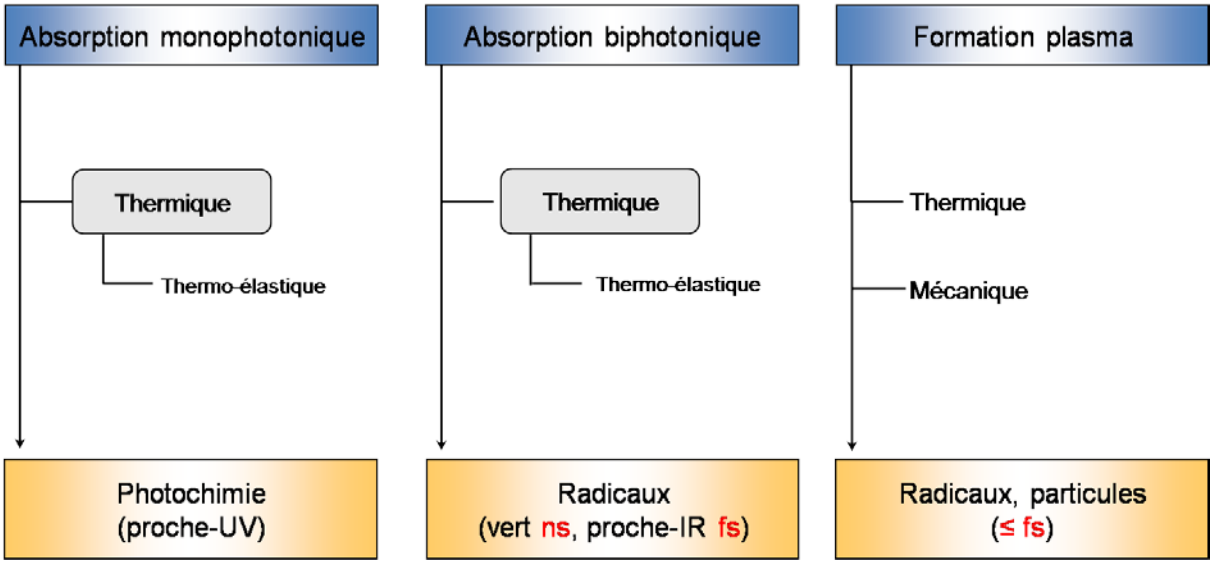


Figure 1 : Mécanismes physiques responsables d'induction des dommages de l'ADN par différents types de laser : proche-UV, Vert à des impulsions nanoseconde, proche-infra-rouge dans le domaine femtoseconde (d'après Kong et al. (2009) (261)).

Meldrum et al. ont montré que l'utilisation d'un laser produisant des impulsions nanoseconde dans le proche infra-rouge (800 nm) produit, via un mécanisme d'absorption biphotonique, des lésions dans l'ADN voisines de celles obtenues avec les rayons UV telles que les dimères de pyrimidine cyclobutane (voir chapitre I, § 2.2) (341). Lan et al. ont par la suite montré que différentes lésions de l'ADN pouvaient être obtenues en utilisant un rayon laser UV-A à 365 nm, allant des dommages de bases aux cassures simple-brin (273). Par la suite, Mari et al. ont démontré que l'utilisation d'un rayon laser pulsé proche infra-rouge à 800 nm produit également des cassures double-brin de l'ADN (324). Ces cassures seraient provoquées par une excision de l'ADN au niveau du spot laser. Dans les chromosomes en métaphase, cette excision introduit des espaces d'environ 100 nm correspondant à la perte d'approximativement 65 kb (262).

Dans notre travail, le recrutement de protéines fluorescentes dans le noyau des cellules vivantes a été suivi par vidéo-microscopie en temps réel après dommages localisés de l'ADN produits par un faisceau laser continu émettant en continu à 405 nm à puissance constante (50 mW en sortie de laser) pendant un temps maximum de 500 ms. Le spot laser a un diamètre constant de 176 nm. Les dommages de l'ADN formés dans ces conditions sont induits par un effet thermique (augmentation de la température), un effet thermo-élastique et des radicaux produits à l'issue d'un mécanisme biphotonique.

Nous mentionnons pour mémoire que d'autres méthodes s'appuient sur une utilisation de rayonnement UV-A dans des cellules ayant incorporé dans leur ADN des analogues halogénés de la thymidine (bromodésoxyuridine, iododésoxyuridine). Cette méthode produit des cassures simple-brin et double-brin de l'ADN au terme d'une réaction photochimique, c'est à dire nécessitant l'absorption du phton lumineux par le composé d'intérêt (312). Une variante de cette méthode utilise des colorants intercalants tels que le Hoechst en association (525) ou non (49) avec les analogues halogénés de la thymidine. Dans ces conditions, l'irradiation produit des cassures double-brin de l'ADN. Plus récemment, Dinant et al. (124) ont comparé les lésions obtenues à partir de trois faisceaux laser (800 nm, 405 nm avec pré-traitement au Hoechst 33342 et laser à 266 nm). Ils ont pu mettre en évidence une grande variété de lésions de l'ADN allant des dimères de pyrimydine cyclobutane, aux cassures simple- et double-brin de l'ADN. Cependant, des trois méthodes comparées, l'utilisation du laser à 405 nm en association au Hoechst 33342 induit une réponse cellulaire aux cassures double-brin profondément différente des autres irradiations étudiées pour des raisons qui restent assez largement incomprises.

1.2. Rayonnement électromagnétique γ

Les rayons γ sont des photons issus des désexcitations (retour à l'état stable) des noyaux excités par les désintégrations α, β^- et β^+ : ${}^{A}_{Z}X^{*}$ (noyau excité) → ${}^{A}_{Z}X$ (noyau stable) + ${}^{0}_{0}\gamma$ (photon γ). Les photons γ sont de même nature que les rayons X, seule la méthode de génération les distingue. En pénétrant dans la matière, les photons déposent de l'énergie d'une manière qui varie avec la profondeur. La dose absorbée passe d'abord par un maximum ou "Crête de Tavernier", avant de décroître exponentiellement avec la profondeur. Ce maximum se situe à environ 1 cm de profondeur pour les rayons γ de 662 keV du ^{137}Cs.

Lors de l'interaction entre un photon et la matière, trois effets peuvent se produire. Leur proportion dépend du matériau traversé et de l'énergie du photon incident.

- **l'effet photoélectrique** : l'effet photoélectrique est lié à l'absorption d'un photon par un électron de la couche d'un atome. C'est un phénomène résonant. Le phénomène s'accompagne de l'éjection d'un électron et de la production d'électrons Auger à la suite de la réorganisation du cortège électronique de l'atome.

- **l'effet Compton** : l'énergie du photon est transférée en partie à un électron des couches périphériques de l'atome cible, avec émission d'un électron secondaire possédant l'énergie échangée dans l'interaction.

- **l'effet de production de paire** : ce phénomène nécessite un photon d'une énergie supérieure à 1,022 MeV. Le photon interagit avec le noyau des atomes, créant ainsi l'émission d'une paire positon/négaton (émission β^+/β^-). Le positon s'annihile ensuite en créant deux photons de 511 KeV.

Lors de mon travail de thèse, les cellules on été irradiées au moyen d'une source ^{137}Cs délivrant des rayons γ monochromatiques à une énergie nominale de 662 KeV (TEL 0,91 KeV/µm) à une profondeur équivalent eau de 3,5 mm assurant l'équilibre électronique.

2. Les effets chimiques et biologiques des rayonnements ionisants

Les réactions physico-chimiques, ionisation et excitation, des RI provoque dans la matière vivante déférents évènements successifs. Ces évènements commencent par des réactions chimiques, effet direct ou indirect, ciblant des molécules biologique comme l'ADN

et par conséquence la chromatine. Les modifications qui peuvent avoir lieu au niveau moléculaire ont des effets au niveau cellulaire.

2.1. Les effets chimiques, directs et indirects, des rayonnements ionisants

Chimiquement, les rayonnements ionisants peuvent avoir deux modes d'action, sur les différentes molécules de la matière vivante, connues par l'effet direct et l'effet indirect des RI (Figure 2).

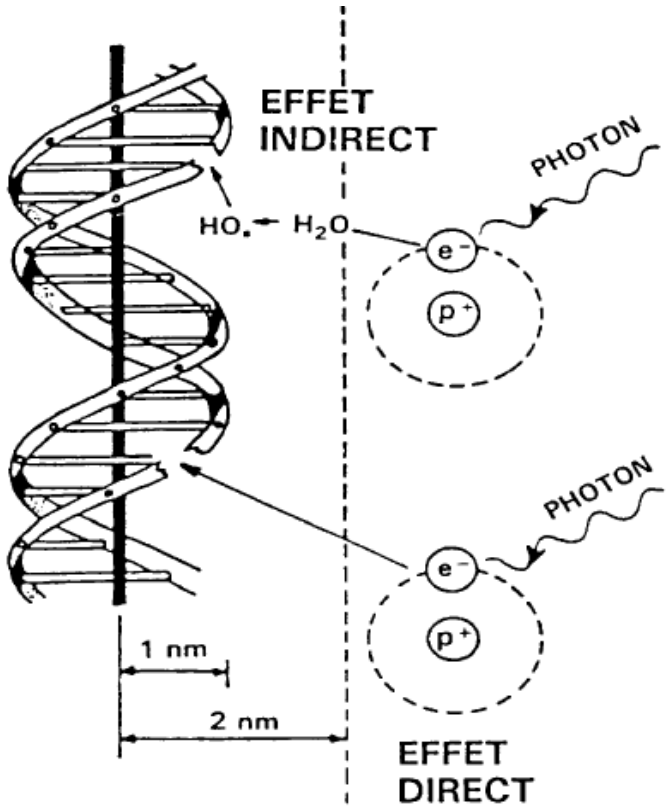


Figure 2 : Effet direct et indirect de rayonnement X et γ (d'après E.J. HALL 1978 (197)).

L'effet direct : il s'agit de l'ionisation directe de la molécule d'intérêt biologique, comme par exemple la molécule d'ADN. Cet effet contribue à hauteur d'environ 10% à l'effet global des rayonnements ionisants (voir p. 25).

L'effet indirect : c'est un effet indirect parce qu'il implique la molécule d'eau comme intermédiaire. L'eau est le composant majoritaire de toute structure vivante (70 % de la masse corporelle), ce qui fait des interactions des RI avec les molécules d'eau les plus probables. Au cours de cette interaction, la molécule d'eau subit un processus appelé radiolyse (Figure 3).

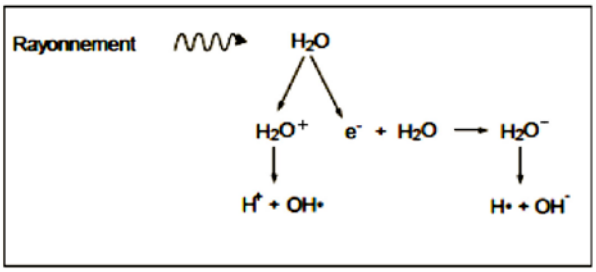


Figure 3 : Radiolyse de l'eau : après ionisation par un rayonnement ionisant la molécule d'eau devienne instable et se fragmente en un ion H^+ et d'un radical $OH^\bullet$. L'électron éjecté se recombine avec une autre molécule d'eau ce qui introduit une instabilité et la création d'un ion OH^- et d'un radical $H^\bullet$.

L'effet indirect est donc le résultat d'interaction des produits (radicaux libres) de la radiolyse de l'eau avec les autres molécules présente dans la structure vivante. Bien que la durée de vie des radicaux libres est très courte, de l'ordre de 10^{-15} à 10^{-16} s, elles sont très réactives et réagissent, par oxydation ou réduction, avec toutes les molécules qu'elles puissent rencontrer dans une solution aqueuse, telles que la molécule d'ADN dans le milieu intracellulaire.

2.2. Les effets des rayonnements ionisants sur l'ADN

Les effets des RI s'exercent sur les différents compartiments et macromolécules de la cellule : protéines, sucres, lipides, acides nucléiques (ARN, ADN) (pour revue voir (340)). Cependant les lésions infligées, par les RI, sur ces différents constituants cellulaires n'ont pas la même importance en termes de dangers pour la vie de la cellule et l'organisme vivant en générale. Les lésions de l'ADN sont les plus importantes car elles peuvent induire des effets mutagènes ou létaux. Grâce à sa sensibilité et son rôle capital dans l'assurance de la reproduction et la synthèse des protéines assurant la fonctionnalité des différents processus cellulaires, l'ADN est la cible biologique la plus critique des RI. En effet, le taux de survie cellulaire à une dose précise est inversement proportionnel à la quantité d'ADN du noyau.

Dans le cas d'un rayonnement à faible TEL, comme les rayons X et γ, environ 10% des dommages sont la conséquence d'effet direct et la grande majorité sont la conséquence d'effet indirect. Dans les deux cas, effet direct ou indirect, tous les éléments de l'ADN, bases ou squelettes phosphodiester sur un ou deux brins, peuvent êtres affectés. Ainsi les RI induisent une grande variété de dommages au niveau de l'ADN (Figure 4) : dommages de bases puriques ou pyrimidiques (modifications ou pertes de bases), CSBs et CDBs, pontages de l'ADN (ADN-ADN ou ADN-proteine) et dommages multiples localisés (LMDS : *locally multiply damaged sites*). Il est vrai que la plupart de ces lésions sont quotidiennement induites

de façon spontanée par le métabolisme oxydatif (Tableau 1), mais leurs proportion sont très différentes de celles induites par les RI (56,132,529).

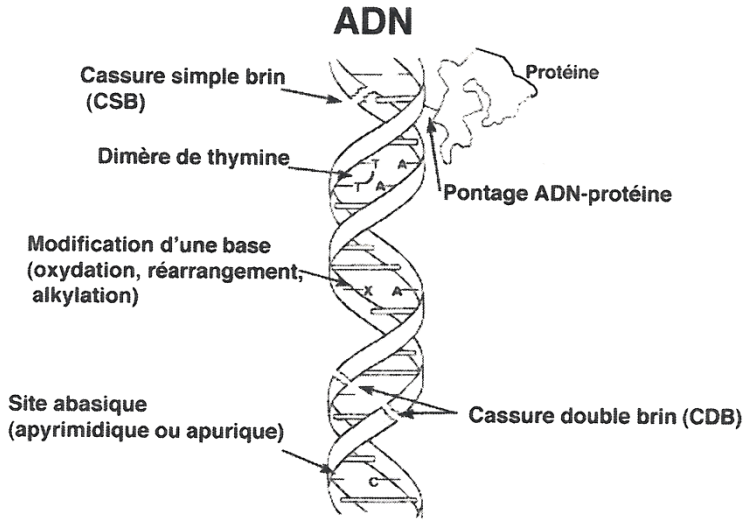


Figure 4 : Schéma représentatif des différents types de lésions radio-induites de l'ADN. (Source : Radiobiologie (ISBN 2 70566530 7) Tubiana M, ed., Hermann-Médecine, Paris, 2008).

Tableau 1: Dommages de sources endogènes et radio-induits de l'ADN (d'après Ward (1988) et Burkart et *al.* (1999) (56,529)).

Type de dommage	Taux de dommage induits spontanément / cellule / jour	Fréquence de dommages radio-induits / cellule / Gy
Cassures simple-brin	55000	1000
Perte de bases puriques	12000	
Perte de bases pyrimidiques	600	
Dommages de bases		2000
Déamination de cytosine	200	
Oxydation de bases	>1000	
Méthylation de la guanine	3000	
Cassures double-brin	8	40
Pontage ADN-ADN	8	30
Pontages ADN-Protéine	Quelques uns	150

2.2.1. Les dommages de bases (DB)

Les dommages de bases induits par les RI peuvent consister en la modification d'une base purique ou pyrimidique ou, carrément, de sa perte. Les modifications de bases sont

généralement détectées par des méthodes chromatographiques puis identifiées par spectrométrie de masse (MS). Les DB les plus fréquents et variés, après IR, sont les bases oxydées (voir Sevilla and Bernhard pp 191-201 dans (340)).

L'oxydation des bases pyrimidiques résultent essentiellement de l'attaque par les radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$) des cycles aromatiques de ces bases, en position 5 de la thymine et de la cytosine, formant un peroxyde en présence d'oxygène. La thymine et la cytosine peuvent aussi être attaquées par l'électron hydraté (e_{aq}) produisant la 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine (thymine glycol), la plus abondante (62), et la 5,6-dihydrocytidine.

Les bases puriques s'avèrent moins radiosensibles que les bases pyrimidiques. Elles peuvent également êtres oxydées par attaque des radicaux $OH^{\bullet}$. Les produits majeurs de cette attaque sont les 8-oxo-7,8-dihydropuriques (8-oxo-G, 8-oxo-A) dont la 8-oxo-G est la plus fréquente (61,62,131).

2.2.2. Les cassures simple-brin (CSBs)

C'est le type de dommage le plus fréquent dans la cellule, qu'il soit spontané dû au métabolisme oxydatif ou radio-induit (Tableau 1). Le taux de formation de ces CSBs est proportionnel à la dose. Un rayonnement ionisant de faible TEL provoque, généralement par effet indirect, environ 1000 CSB par cellule irradiée. La majorité des CSBs radio-induites surviennent au niveau de la liaison phosphodiester (3' ou 5') entre le phosphate et le 2-désoxyribose, souvent à la suite de l'arrachement d'un atome d'hydrogène du sucre par les radicaux $OH^{\bullet}$ (143). Les études in vitro sur de l'ADN plasmidique ont montré que les CSB radio-induites présentent en grande majorité une extrémité 3'-phosphate ou phosphoglycolate (35). L'arrachement de l'atome d'hydrogène du 2-désoxyribose est plus difficile en cas de manque d'oxygène ce qui fait que le nombre des CSBs est 3 à 4 fois moins élevées dans les cellules hypoxiques que dans des cellules bien oxygénées.

Les CSBs sont identifiées par multiples méthodes telles que la chromatographie alcaline, l'élution alcaline et le test des comètes (94,132,387). Afin de pouvoir analyser les cinétiques de religation des CSBs radio-induites nous avons choisi, dans mon travail de thèse, la technique d'élution alcaline parce qu'elle est basée sur l'étude des CSBs dans une large population cellulaire, et non sur des cellules isolées, permettant ainsi une analyse statistique plus fine.

2.2.3. Les cassures double-brin (CDBs)

Une cassure double-brin est une rupture des deux chaînes d'ADN à des sites distants de quelques nucléotides. Comme les CSBs, la plupart des CDBs radio-induites sont dues à l'effet indirect des RI à faible TEL et leur taux est proportionnel à la dose (39,223). Un rayonnement ionisant à faible TEL induit environ 40 CDB par cellule et par Gray (Tableau 1). En général, après RI et radiolyse de l'eau, une CDB est formée soit par 1) l'action d'un seul radical $OH^{\bullet}$ sur un désoxyribose d'un seul brin avec transfert du radical sur le deuxième brin, soit par 2) l'attaque des deux brins par deux radicaux OH, formés sur la trajectoire de la même particule ionisante, sur deux sites voisins (123). La probabilité de formation d'une CDB par conjonction de deux CSBs produites le long des trajectoires de deux particules ionisantes distinctes est très faible (< à 10^{-8}). Une CDB est dite homologue si elle se produit au niveau de la même paire de bases, hétérologue dans le cas contraire. Les CDBs hétérologues sont les plus fréquentes.

Les CDBs étant des lésions particulièrement létales (22), elles jouent un rôle déterminant pour la survie après irradiation (123,223). Cependant, une fraction non négligeable des CDBs radio-induites est difficilement réparable.

L'étude des CDB s'est longtemps heurtée à la difficulté de leur détection et de leur quantification. Cette difficulté à été surmontée par les techniques d'élution neutre sur filtre (260), par l'électrophorèse en champs pulsés (40), et puis par détection des foyers γH2AX (427), forme phosphorylée de l'histone H2AX.

2.2.4. Les pontages de l'ADN

On distingue trois types de pontages radio-induits impliquant l'ADN : ADN-ADN intra-brins, ADN-ADN inter-brins et ADN-protéines. Ces derniers sont dus à la formation, par $OH^{\bullet}$, de deux radicaux sur les bases de l'ADN et les acides aminés des protéines donnant lieu à la formation de liaisons covalentes entre les protéines et l'ADN (62). De même, la formation des pontages ADN-ADN est aussi provoqué par les radicaux $OH^{\bullet}$ (62,477). Les dommages dus aux pontages ADN-protéines sont peu étudiés. Cela tient en grande partie à la difficulté technique de leur mise en évidence et à leur quantification. Les pontages de l'ADN peuvent être très critiques pour les cellules car ils sont susceptibles d'interrompre différents mécanismes vitaux comme la réplication et la transcription. La réparation de ces lésions requiert la formation d'une CDB qui sera prise en charge par les systèmes de réparation classique des CDBs.

2.2.5. Les dommages multiples localisés

(*Locally Multiply Damaged Sites*: LMDS)

Les LMDS sont constitués de dommages de bases, de CSBs et/ou de CDBs tous réunis sur un, ou deux pas d'hélice de l'ADN (10 à 20 paires de bases) (131,132). Contrairement aux autres types de dommages, les LMDS ne sont pas formés spontanément au cours du métabolisme oxidatif (484) ni en réponse aux UV (475). Ils ne proviennent que de sources exogènes, principalement des agents chimiques radiomimétiques (bléomycine) et des RI. Dans le cas des RI, ils résultent de l'attaque de l'ADN par des radicaux générés le long de la trajectoire d'une seule particule ionisante. Ceci est la raison pour laquelle le taux des LMDS est plus élevé pour les particules à à haut TEL qu'à faible TEL (181,372).

La détection des LMDS, in vitro, est indirecte parce qu'elle fait appel à la transformation des dommages de bases et des CSBs par des nucléases, en CDBs détectables par électrophorèse en champs pulsé (175,181,193).

2.3. Les effets des rayonnements ionisants sur la chromatine

Les effets de rayonnements ionisants au niveau chromatinien sont les conséquences des lésions de l'ADN et de leurs mécanismes de réparation. La dynamique post-irradiation, de la chromatine est de grande importance pour la réponse de la cellule aux RI parce qu'elle interfère avec toute les phases de réparation des dommages de l'ADN. En effet, les dommages de l'ADN provoquent, par l'intermédiaire des facteurs chromatiniens, la décondensation de la structure chromatinienne donnant accès aux protéines de la réparation (Introduction générale § IV.1.4). Après réparation des dommages, la structure chromatinienne est sensée revenir à l'état initial.

Des études menées sur multiples lignées tumorales ont montré que l'effet létal des RI est proportionnel non seulement à l'augmentation du nombre des CDBs non réparées, mais aussi à l'augmentation du pourcentage de la chromatine décondensée (81).

Les lésions de l'ADN (CDBs) et les remaniements chromatiniens dus au RI peuvent provoquer à l'échelle chromosomique des anomalies (aberrations) de structure. Le taux des aberrations issues d'échange inter-chromosomiques induit par RI, soit à faible TEL ou à haut TEL, est plus élevé que les aberrations issues d'échange intra-chromosomiques (53,54).

2.4. Les effets des rayonnements ionisants au niveau cellulaire

Les effets cellulaires des RI sont en grande partie la conséquence des dommages de l'ADN. Ils s'expriment par 1) l'apparition d'un stress oxydatif et une chute du potentiel redox mitochondrial ; 2) l'activation des voies de signalisation modifiant l'expression des gènes et/ou diverses activités protéiques ; 3) une modification ou altération du cycle cellulaire ; et 4) l'apparition des mutations et des aberrations chromosomiques. Ensembles, ces effets se traduisent dans la réduction de la survie, qui constitue cependant l'effet recherché pour la stérilisation des tumeurs en radiothérapie.

Les tests clonogéniques in vitro, ont été établis vers le milieu des années 1950. Ils ont permis de décrire la réponse au rayonnement des cellules saines et tumorales à travers la croissance de colonies cellulaires, et de mettre en évidence des différences de radiosensibilité d'une lignée à l'autre.

Les facteurs jouant sur la radiosensibilité cellulaire sont :

Le type cellulaire : les cellules à pouvoir de prolifération ou renouvellement rapide (moelle osseuse, spermatozoïdes ou cellules basales de l'épiderme) sont plus radiosensibles que les cellules différenciées à renouvellement lent et durée de vie longue (cellules hépatiques, rénales ou neuronales).

La phase du cycle cellulaire : la radiosensibilité est souvent maximale en G2 et M et toujours minimale en S.

L'environnement cellulaire : les cellules en hypoxie sont moins radiosensibles que des cellules bien oxygénées. Ceci s'explique par l'augmentation de radicaux libres en présence d'oxygène.

La nature du rayonnement : à dose unique, la radiosensibilité est plus faible pour un rayonnement à faible TEL que pour un autre à haut TEL.

La distribution de la dose dans le temps : à dose unique, le fractionnement de la dose et la diminution de son débit permettent d'augmenter la survie cellulaire.

La mise en évidence de ces facteurs était à l'origine de la radiobiologie quantitative et a donné naissance à la notion de radiosensibilité intrinsèque, définie par la probabilité de mort cellulaire par unité de dose.

La mort cellulaire radio-induite peut emprunter 5 mécanismes ou faciès, selon les circonstances et l'équipements génétique de la cellule.

La mort immédiate survient en général pour des doses ≥ 10 Gy. Elle est liée à l'hyperactivation de PARP-1 et s'observe dans des cellules exposées à un stress oxydatif

majeur tels que l'ischémie-reperfusion, le choc septique ou un infarctus (voir pp. 62 et 71). Elle s'observe de manière privilégiée dans les cellules surexprimant PARP-1.

La mort différée est liée à l'instabilité génomique et se manifeste par la mort d'une proportion variable de cellules, plusieurs génération après l'exposition aux RI. Les lignées qui subissent ce mode de mort cellulaire sont caractérisées par un faible potentiel clonogénique et l'apparition de micro-colonies.

La mort mitotique s'exprime en conséquence d'une mitose asymétrique ou abortive. Elle est souvent caractérisée par la formation et l'éjection (exocytose) de micronoyaux. La mort survient par oncose (nécrose), apoptose, sénescence ou autophagie, selon l'équipement génétique de la cellule. La mort mitotique est le mécanisme prépondérant dans les lignées épithéliales.

La mort programmée (apoptose) radio-induite se développe en 6 à 72 heures après l'irradiation. Le taux d'apoptose radio-induite est inférieur à 10 % dans les cellules épithéliales et à 2 % dans les fibroblastes.

La sénescence, typique des fibroblastes irradiés, dépend comme l'apoptose de l'intégrité de p53 et doit aussi être considérée comme un mécanisme de mort programmée.

L'autophagie, elle aussi étroitement régulée, et qui peut alternativement jouer un rôle protecteur ou aboutir à la mort cellulaire.

III. Les différentes voies de réparation des dommages de l'ADN

Le maintien de l'intégrité du génome est crucial pour tous les organismes afin de limiter la mutagénèse ou la cyto-toxicité des altérations induites. Il existe plusieurs systèmes de réparation spécialisés destinés à maintenir cette intégrité d'information génétique dont le choix dépend du type de lésions de l'ADN. On distingue quatre voies principales de réparation: la première et sur laquelle est basé une grande partie de mon travail de thèse est la réparation par excision de base (*Base Exision Repair* : BER) mise en place pour réparer les dommages de bases et des cassures simple-brins provoqués par les dommages oxidatifs (endogènes ou exogènes), les radiations ionisantes ou des agents alkylants. La deuxième voie de réparation est l'excision de nucléotides (*Nucleotide Exision Repair* : NER) qui est la plus polyvalente en terme de reconnaissance des lésions. Elle est spécialisée pour les dommages qui provoquent une distorsion de la double hélice d'ADN. Entrent dans cette catégorie par exemple, les lésions occasionnées par les métabolites carcinogènes tel que le benzo(a)pyrène, ou celles provoquées par les rayons UV ou les composés à base de platine utilisés en chimiothérapie. La troisième voie de réparation se présente dans le cas des mésappariement des bases (*Mismatch repair*: MMR), qui résultent principalement des erreurs de réplication par les ADN Polymérases, qui ne peuvent pas être réparées par l'activité 3'→5' exonucléasique de la polymérase. Quatrièmement, on trouve les voies de réparation des cassures double brin, lésions létales provoquées par les radiations ionisantes ou les inhibiteurs de Topoisomèrase II par exemple. Dans cette catégorie, se regroupent les voies de réparation par suture non-homologue (*Non Homologous End-Joining* : NHEJ), par recombinaison homologue (*Homologous Recombination* : HR) et par resoudure simple de l'ADN (*Single Strand Annealing* : SSA) La majorité des ces voies de réparation impliquent un grand nombre de protéines qui agissent de façon coordonnée pour réparer la(les) lésion(s) et en relation avec les voies de signalisation qui régulent la prolifération.

De plus, du fait du fort pouvoir mutagène de la base méthylée O^6-methylguanine, une voie spécifique de réparation de cette lésion existe dans les cellules de mammifères, assurée par l'enzyme O^6-methylguanine DNA-methyltransférases (MGMT).

Le tableau suivant résume différentes sources des dommages de l'ADN, les types des dommages et les principales voies de réparations appropriées.

Tableau 2 : Spécificités des voies de réparation des différents dommages de l'ADN.

Source du dommage	Type du dommage	Voie de réparation
Radiations ionisantes Espèces activées de l'O_2 Agents alkylants	Dommages de base Sites abasiques Cassures simple-brin	Excision de base (BER)
CisPlatine Rayons UV Mitomycine C	Pontages Adduits Dimère de pyrimidine	Excision de nucléotide (NER)
Erreurs de réplication CisPlatine Agents alkylants	Bases mal appariées Insertion Délétion	Réparation des mésappariements (MMR)
Radiations ionisantes Bléomycine Poisons topoisomérase I & II	Cassures double-brin	Recombinaison homologue (HR)
Radiations ionisantes Bléomycine Poisons topoisomérase I & II	Cassures double-brin	Jonction non homologue (NHEJ)
Radiations ionisantes Bléomycine Poisons topoisomérase I & II	Cassures double-brin	SSA

Les conséquences cliniques délétères des anomalies héréditaires présentes au niveau des systèmes de réparation de l'ADN sont révélées dans plusieurs pathologies. Par exemple, les patients atteints de *Xeroderma Pigmentosum* (XP) (où la voie de réparation du NER est altérée), ceux atteints *d'Ataxia Telangiectasia* (AT) ou du syndrome de *Nijmegen* (où les voies de réparation des CDBs sont compromises), ainsi que les patients *Li-Fraumeni* (atteinte des différentes voies impliquant la protéine p53), présentent une prédisposition accrue au cancer (210,263,275,401).

Certains défauts dans les voies de réparation de l'ADN apparaissent sous la forme d'un syndrome de viellissement précose tel que le syndrome de *Werner* (366). D'autres anomalies, et tout particulièrement celles associées à la réparation des dommages oxydatifs, se manifestent principalement dans les neurones et sont associées à des maladies neurodégénératives telles que l'ataxie avec aprataxie oculomotrice de type 1 ou l'ataxie spinocérébelleuse de type 1 (65).

1. Voies de réparation des dommages de bases (BER) et des cassures simple brins (SSBR)

Le BER est la voie de réparation majoritaire pour la réparation des lésions des bases de l'ADN et est la plus polyvalente puisqu'elle intervient aussi bien dans la réparation des dommages de bases dus à des agents oxydants, alkylants ou de désamination (243,298,453). De plus, les cassures simple-brins générées par les ROS, les produits dérivés du métabolisme cellulaire ou l'irradiation (X et γ) sont réparées par la voie de réparation des cassures simple-brins (SSBR) qui utilise les protéines du BER et n'en diffère que dans les étapes initiales de reconnaissance des lésions. En effet, les premières étapes de reconnaissance du dommage et d'élimination des lésions de l'ADN sont spécifiques de chaque voie, alors que les dernières étapes qui impliquent le remplissage de la brèche, et la ligation de l'ADN leur sont communes. Le BER répare les lésions de bases selon deux sous-voies dans les étapes finales : le Short-patch et le Long-patch. Dans les deux cas, l'étape initiale passe par la reconnaissance de la(es) base(s) endommagée(s) qui va déterminer la spécificité de la réparation (431) (Figure 5).

Les CSBs directement formées, par exemple par des radiations, sont prises en charge par le SSBR. Ce mécanisme commence par la détection, par des protéines spécifiques parmi lesquelles PARP-1 est celle qui a le plus d'affinité pour ces lésions. La CSB sera ensuite, comme lors du BER, prise en charge par le SPR ou le LPR.

Les défauts de la réparation des SSB ou des dommages de bases peuvent avoir de multiples conséquences sur le devenir des cellules et peuvent conduire à l'instabilité du génome ou la mort cellulaire et à l'inverse peut favoriser l'apparition de cellules tumorales résistantes aux traitements. Des polymorphismes nucléotidiques dans les gènes de la réparation des dommages de bases sont associés à une augmentation du risque de cancers (290,355). Cependant, l'inactivation des protéines essentielles du BER/SSBR conduit à une mort embryonnaire montrant l'importance vitale de ces processus.

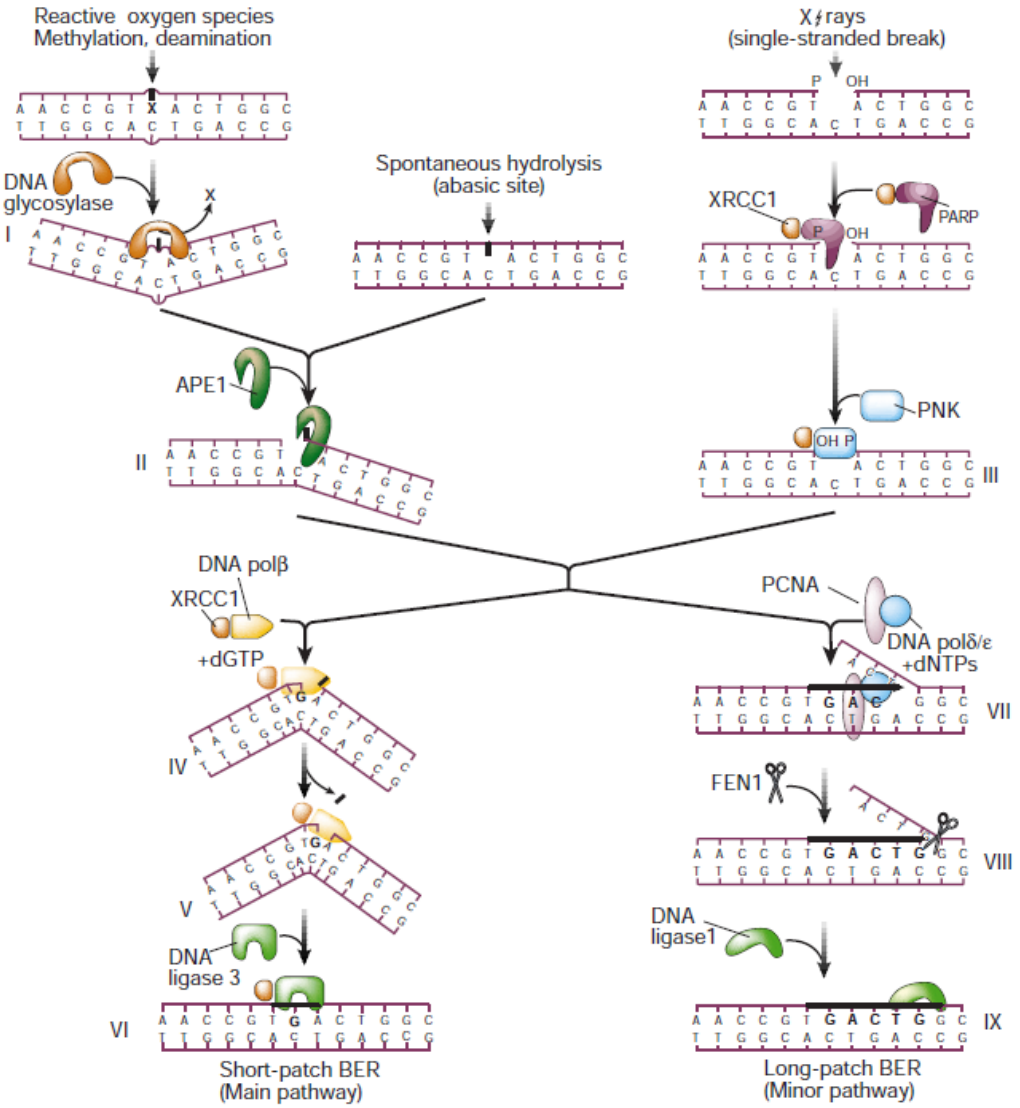


Figure 5 : Schéma représentatif de la réparation des bases endommagées, des sites abasiques et des CSBs par le BER/SSBR : voies du *Short* et du *Long Patch repair* (d'après Hoeijmakers (2001) (210)).

1.1. Détection des bases endommagées lors du BER (*Base Excision Repair*)

Les lésions de bases sont reconnues par distinctes glycosylases qui rendent le BER possible en excisant la base endommagée. A ce jour 11 glycosylases différentes ont été identifiées chez les mammifères. Ces mêmes glycosylases sont exprimées chez E. coli. Chaque glycosylase agit sur un nombre limité de bases endommagées spécifiques. Les ADN glycosylases sont des protéines monomériques, relativement petites (~30-50 kDa), qui n'exigent aucun cofacteur pour leur activité. Les bases endommagées sont dans un premier temps excisées par l'une des ADN-glycosylases bifonctionnelles ou monofonctionnelles dont la fonction principale est de reconnaître la base endommagée et de catalyser le clivage d'une liaison N-glycosydique, donnant une base libre et créant un site abasique (AP) (299).

L'Uracil-ADN glycosylase (UNG) était le premier ADN glycosylase identifié (299). Ayant seulement une activité glycosylase cette enzyme appartient à la famille des glycosylases monofonctionnelles qui n'ont qu'une activité d'élimination de la base et d'incision en 5' de la lésion (Tableau 3) (453). Certaines glycosylases bi-fonctionnelles qui ont en plus une activité AP-lyase associée, coupent l'ADN en position 3' produisant ainsi une extrémité forme canonique, 3' OH et 5' phosphate pour permettre l'ajout d'un nucléotide et la ligation (381).

Par exemple, toutes les ADN glycosylases spécifiques des bases oxydées sont bi-fonctionnelles parce qu'elles ont en plus cette activité lyase qui clive, par éliminationβ ou β, δ (333,353), l'ADN à la liaison phosphodiester en 3' du site AP formé après l'excision de base générant une extrémité 3' bloquée par un aldéhydeα , β-insaturé (cas d'éliminationβ) ou 3' phosphate (cas d'éliminationβ, δ) (333,353). Parmi les glycosylases bi-fonctionnelles (Tableau 3) nous citons la 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1), l'endonucléase III homologue (NTH1) et les endonucléases VIII-Like 1 et 2 (NEIL) (18,42,205,221,243,253).

Tableau 3 : Les ADN glycosylases chez les mammifères.

Glycosylase	Type	Substrats	Références
UNG2	Monofonctionnelle	U	(266,389)
SMUG1	Monofonctionnelle	U, OHMeU	(44,204)
TDG	Monofonctionnelle	U:G, T:G, ethenoC	(369,533)
MBD4	Monofonctionnelle	U :G, T :G dans sites CpG	(208,403)
OGG1	Bifonctionnelle	8oxoG :C, FapyA, FapyG	(419,432,435)
MYH	Monofonctionnelle	A :8oxoG	(469,470)
NTH1	Bifonctionnelle	Pyrimidines oxydées et fragmentées (exemple : Tg, DHU), Fapy	(18,221)
AAG (MPG)	Monofonctionnelle	3-meA, 7-meG, ethenoA, ethenoG, hypoxanthine	(78,381,443)
NEIL1	Bifonctionnelle	FapyA, FapyG, dihydrouracil, thymine glycol, 8-oxoG	(227,435)
NEIL2	Bifonctionnelle	Produit d'oxydation de la cytosine (5-OHU, DHU)	(130)

La génération continue de sites AP est plus toxique que les bases endommagées elles-mêmes (200). Les enzymes AP endonucléases qui clivent les liaisons phosphodiesters en position 3' génèrent des CSBs. L'AP endonucléase principale dans les cellules mammifères

est APE1 (200). La première AP endonucléase a été découverte dans E. coli comme une 3' exonucléase et ADN 3' phosphatase, et a été nommé exonucléase III (115), elle a été identifiée par la suite comme étant une AP endonucléase spécifique qui génère des extrémités 3'OH après clivage de l'ADN au niveau des sites abasiques formant ainsi des CSBs. La létalité embryonnaire des souris nullizygotes pour le gène *Apex1* montre bien l'importance fonctionnelle d'APE1 (339,541). De plus, plusieurs études avaient montré que la sous-expression ou la mutation d'APE1 conduit à l'accumulation de sites abasiques et de CSBs, et à l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires humaines (142,226,354).

Une deuxième AP endonucléase, APE2, a été identifiée dans les cellules de mammifères (194,504), et serait impliquée dans la réparation de l'ADN nucléaire et possiblement de l'ADN mitochondrial (57,504).

1.2. Détection des cassures simple brins dans le SSBR (*Single Strand Break Repair*)

Les CSBs formées directement, par exemple après exposition aux RI, sont détectées par la PARP-1 et, probablement, par la PARP-2. Ces protéines se lient rapidement aux cassures d'ADN ce qui stimule leur activité de poly(ADP-ribosylation) (12,32,178,384). Cependant, PARP-2 est recrutée au niveau de ces cassures moins rapidement que PARP-1 (362). Une fois activées, PARP-1 et 2 s'auto-modifient et modifient d'autres protéines cibles par la synthèse, à partir des molécules de NAD^+, de longues chaînes, linéaires ou branchées, de poly(ADP-riboses) (PAR) (98,109,277,383). Généralement, le premier ADP-ribose est ajouté au carboxyle γ d'un des acides aminés Glutamiques des protéines acceptrices (452). Les PAR sont chargés négativement et leur accumulation a donc pour effet de diminuer l'affinité de la PARP-1 auto-ribosylée envers la molécule d'ADN par répulsion électrostatique (155). De part cette répulsion de charge, la liaison et l'activité de PARP-1 aux CSBs sont donc très transitoires (155,550). Les PAR sont ensuite rapidement dégradés par la PARG, permettant de nouveau le recrutement et la réactivation de PARP-1 à n'importe quelle autre CSB (550).

La réparation des CSBs par le SSBR, dépend donc du NAD^+ via l'activité catalytique de PARP-1 et 2 (6,12,445,446). En effet, l'inhibition de l'activité catalytique des PARPs par des inhibiteurs chimiques ou la surexpression du domaine liant l'ADN (DBD : *DNA binding domain*) de la protéine, provoquent un retard de la réparation des CSBs (17,356,399). Parallèlement, les souris invalidées pour le gène *Parp-1* ou *Parp-2* sont, respectivement, hypersensibles ou sensibles aux agents alkylants et aux RI (110,343,503,528). Les fibroblastes (3T3-*Parp-1*$^{-/-}$) et les fibroblastes embryonnaires immortalisés (*Parp-2*$^{-/-}$) issus de ses animaux manifestent une instabilité génomique, des retards dans la religation des CSBs, des

anomalies de la ploïdie, un taux d'échanges de chromatides sœurs (*Sister Chromatid Exchange*, SCE) élevé et la formation de micronoyaux après traitement par des agents génotoxiques (110,343,451,503,528). La double délétion des gènes *Parp-1* et *Parp-2* est létale au niveau embryonnaire (12). Nous verrons, cependant, que l'invalidation de PARP-2, contrairement à l'invalidation de PARP-1, a peu d'incidence sur la survie des lignées humaines en réponse aux rayonnements.

PARP-1 et la synthèse des PAR ont une influence majeure sur la structure de la chromatine pendant le BER/SSBR. En effet PARP-1 poly(ADP-ribose)yle des résidus d'histones H1 et H2B (409,426) permettant la relaxation de la fibre chromatinienne de 30 nm ce qui facilite l'accès des autres facteurs du BER/SSBR. Avant ce travail de thèse la contribution de PARP-2 dans le remaniement de la structure chromatinienne en réponse aux dommages de l'ADN n'était pas encore connue.

1.3. Rôle de coordination par XRCC1 lors du BER et du SSBR

XRCC1 (*X-Ray Cross Complementing protein 1*) est une protéine d'assemblage sans activité enzymatique connue. Elle interagit physiquement et fonctionnellement avec la plupart des acteurs du BER et du SSBR via ces deux domaines BRCT (BRCA1 *C-terminal domain*), pour faciliter leur recrutement, leur stabilisation aux sites de dommages et stimuler leur action lors de la réparation. Ces propriétés en font de XRCC1 un coordinateur de la réparation lors du BER et du SSBR (65,66).

PARP-1 auto-ribosylée recrute, stabilise et accumule XRCC1 au niveau de la CSB (101,136,328). Mortusewicz et al. avaient montré que le recrutement de XRCC1 au site du dommage de l'ADN, chez les MEFs (*Mouse Embryonic fibroblaste*), dépend majoritairement de PARP-1. En même temps, ils ont observé un très lent recrutement de XRCC1 dans les MEFs dépourvus de PARP-1 ce qui suggère une possible contribution de PARP-2 dans le recrutement de XRCC1 aux sites de dommages (362).

D'autres études ont permis de mettre en évidence des modes de recrutement de XRCC1 aux sites de dommages indépendants de PARP-1. Ces fonctions de XRCC1 dépendent de son interaction via l'interdomaine 1 et le domaine BRCT1 avec APE1 (519) et avec les glycosylases OGG1 (71,326), NTH1 et NEILs (71).

XRCC1 interagit et stimule différentes protéines impliquées dans les diverses étapes du BER et du SSBR. En effet, l'interaction entre les glycosylases OGG1 (71,326), NTH1 et NEILs (71) et XRCC1 stimule leurs activités enzymatiques ce qui explique son implication dans la réparation des bases endommagées. De plus, XRCC1 interagit avec des enzymes

impliquées dans le traitement des extrémités durant le SSBR incluant APE1 et PNK (519,532). Enfin, l'interaction de XRCC1 avec la Polymérase β et la Ligase IIIα montre que XRCC1 est impliquée même dans des étapes tardives communes du BER et du SSBR.

Par voie de conséquence, les cellules de hamster CHO (*Chinese Hamster Ovary*) déficientes en XRCC1 par voie de mutation (lignées EM7-EM9) montrent une hypersensibilité aux agents alkylants inducteurs de CSB et des dommages de bases (MMS, EMS, MNNG, H_2O_2) (72,497,498). Les lignées cellulaires humaines délétées pour le gène XRCC1 présentent également une hypersensibilité aux agents alkylants (51,52,214).

XRCC1 sert non seulement à coordonner le recrutement et la fonction des enzymes lors du BER et du SSBR, mais aussi à protéger les extrémités de l'ADN contre des réactions de recombinaison néfastes. Un défaut dans XRCC1 donne lieu à un phénotype d'hyper-recombinaison caractérisé par une fréquence élevée d'échanges de chromatides sœurs et la délétion du gène XRCC1 est létale au niveau embryonnaire (493). Chez l'homme, alors qu'il n'a pas été possible d'identifier des lignées sans expression de XRCC1, certains polymorphismes nucléotidiques (SNPs) de XRCC1 sont liés à une augmentation du risque de développer un cancer du poumon ainsi qu'à d'autres types de cancer (85,111,127) (voir (480)). Ces résultats suggèrent que la modification d'amino-acides due à ces polymorphismes dans certains domaines de XRCC1 est associée à une altération fonctionnelle de la protéine.

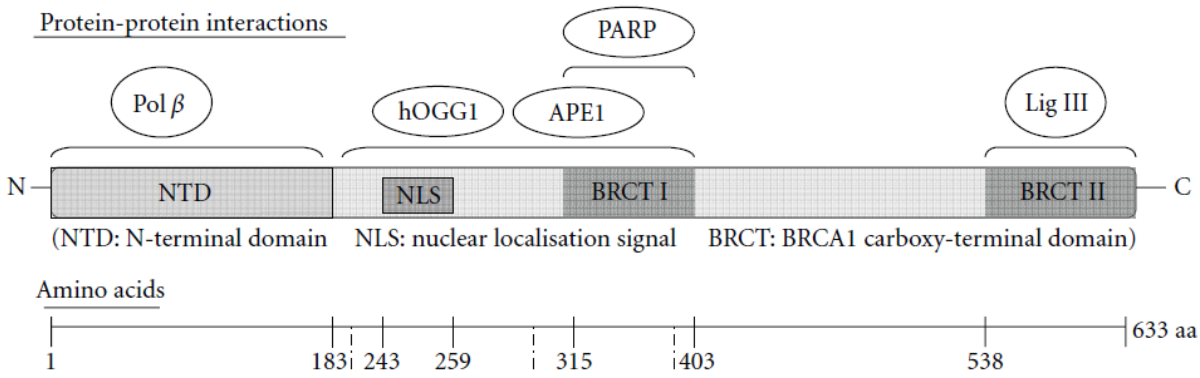


Figure 6: Domaines de XRCC1 humaine, positions de ses sites de liaison avec les protéines partenaires (d'après Sterpone and Cozzi (2010) (480)).

1.4. Les étapes communes du BER et du SSBR

1.4.1. Traitement des extrémités des CSBs

Les extrémités de la plupart des CSBs formées soit spontanément après exposition aux RI (par exemple : 3'-phosphate, 3'-phosphoglycolate, 5'-OH, 5'-désoxiribose-phosphate) ou suite à l'action d'une glycosylase (par exemple : 3'-aldéhyde α, β-insaturé, 3'-phosphate, 5'-

OH), sont souvant de nature complexe. La grande hétérogénéité des terminaisons nécéssite un grand nombre d'enzymes impliquées dans la restitution des formes canoniques, 3'OH et 5'phosphate, pour permettre le remplissage des brèches puis leur ligation. La protéine APE1, la kinase polynucléotide (PNK), la DNA polymérase β (Polβ), la tyrosyle phosphodiesterase 1 (TDP1) et la flap endonucléase-1 (FEN-1) sont les principales enzymes responsables des traitements des terminaisons non canoniques.

APE1 : APE1 est impliquée dans le traitement des sites AP et des extrémités des CSBs parce qu'en plus de son activité endonucléasique, elle est aussi active comme une 3' exonucléase/phosphatase. Elle intervient au niveau des cassures de l'ADN présentant des extrémités 3' bloquées par un aldéhyde, β -insaturé ou par un phosphate, générant des extrémités 3'OH (voir (206)).

Polβ : L'activité 5' désoxyribose phosphate (dRP) de la Polβ lui per met d'éliminer, par réaction β-élimination, les résidus dRP situés en 5' des CSBs formées par l'APE1 (329).

FEN1 : FEN1 intervient après stimulation par PCNA (nous reviendrons sur ces deux protéines dans l'étape suivante du BER/SSBR) et sous certaines conditions, par la présence d'un résidu dRP oxydé ou réduit qui ne peut pas être éliminé par Polβ (304).

PNK : La PNK est responsable de l'élimination des groupements phosphates liés sur les extrémités 3' des CSB générées lors des traitements des bases oxydées par des ADN glycosylases telles que les NEILs (228). En plus de son activité 3'-phosphatase, la PNK a aussi une activité 5'-kinase lui permettant de phosphoryler les extrémités 5'OH (240). Ces deux activités de la PNK font qu'elle a un rôle majeur dans la restitution des extrémitées 3' OH et 5' phosphate.

Aprataxine : L'aprataxine possède une activité d'hydrolyse ADN-AMP qui lui permet d'exciser les groupements adénylés et de les remplacer par des résidus 5'-dRP qui seront à leur tour excisés par l'activité dRP lyase de Pol β (423). L'intervention de l'aprataxine nécessite une interaction avec le complexe XRCC1-ligase IIIα (91) via la région C-terminale de XRCC1 (106). Les lignées dépourvues du gène *APTX* présentent un dysfonctionnement dans le SSBR et une sensibilité aux RI et au MMS (91,188,313). Des mutations dans le même gène *APTX* sont responsables d'une pathologie neurologique : l'*Aprataxie Ataxie Oculomotrice* (AOA) (276).

TDP1 : Cette enzyme est connue comme spécifique des extrémités des CSBs formées par le complexe ADN-Topoisomérase 1. Elle élimine la Top1 liée à l'extrémité 3' de la CSB (414,543). L'action de TDP1 entraîne la formation d'une extrémité 3' Phosphate excisé par l'activité 3'-phosphatase de la PNK (137,421).

Dans quelques circonstances, certaines terminaisons 3' bloquées pourraient être traitées par le complexe nucléasique ERCC1/XPF, comme dans le cas du complexe Rad1/Rad10, homologue fonctionnel du complex ERCC1/XPF, chez les levures (190).

Le rôle de XRCC1 dans le traitement des extrémités des CSBs :

XRCC1 joue un rôle très important dans le traitement des extrémités des CSBs. Elle permet le recrutement et la stabilisation aux sites des CSBs, des protéines spécifiques possédant les activités enzymatiques nécessaires au traitement des extrémités non canoniques (273,306).

XRCC1 interagit avec la Polβ (67,268), assurant ainsi son recrutement au site de la CSB (121,273) et stimule son activité (400). De même pour la PNK, dont l'interaction avec XRCC1 stimule son activité au niveau des extrémités des CSBs (306,532). Dans les cellules déficientes pour XRCC1 le traitement des extrémités 3' phosphate et 5'OH, classiquement effectué par PNK, devient une étape cinétiquement limitante pour le SSBR (478,532). L'interaction entre XRCC1 et PNK dépend de la phosphorylation de XRCC1 par la caséine kinase 2 (CK2) (306). De ce fait, la mutation des sites de phosphorylation de XRCC1 spécifiques de CK2 provoque une baisse de l'affinité entre les protéines XRCC1 et PNK et une diminution de l'efficacité de réparation des CSBs (306). De même, la phosphorylation de XRCC1 par CK2 favorise son interaction avec l'Aprataxine et APLF (*Aprataxin Pnk-Like Factor*) (31,188,313) qui sont impliquées dans l'élimination des nucléotides et des bases endommagés aux sites de lésions.

1.4.2. Remplissage et ligation de la brèche

Une fois les extrémités traitées, le remplissage de la brèche peut commencer. Selon le nombre de nucléotides qui seront ramplacés, nous distinguons deux modes du *gap filling* impliquant différentes enzymes spécifiques et différents partenaires (114,120,146,164,250,254,304,365,467). Ces deux sous-voies sont appelées, respectivement, *short-patch* (SPR) pour la voie qui implique la synthèse de 1 ou 2 nucléotides et *long-patch repair* (LPR) pour la voie qui implique la synthèse de 2 à 15 nucléotides.

Plusieurs études *in vitro*, basées sur l'utilisation des molécules d'ADN contenant des dommages prédéfinis, ont montré l'implication de multiples ADN polymérases, la Polβ, la Polδ, la Polε, la Polλ et la Polι dans le BER/SSBR (120,161,164,254,268,330,365,417,467,483,532,535) (voir (64)). Le rôle des polymérases dans le BER/SSBR consiste à insérer le nucléotide ou l'oligonucléotide dans une brèche

comportant des extrémités canoniques, 3'OH et 5' phosphate. Le choix de la polymérase peut dépendre de la source de la CSB et de la taille de la brèche (122,350,351,393).

Cas du *Short-Patch Repair*

En général, la Polβ est la polymérase majoritaire dans le SPR (122,350,351,393). Elle est recrutée au site du dommage par interaction avec XRCC1 (121,325) permettant à son activité polymérase contenue dans le domaine C terminal (270) d'insérer le nucléotide manquant. L'importance fonctionnelle de la Polβ a été confirmée *in vivo*, en montrant sa nécessité pour la réparation rapide des CSBs (160,394). On note que la délétion du gène *Polβ* chez les souris provoque une létalité embryonnaire et que les lignées murines *Polβ*$^{-/-}$ sont hypersensibles au MMS (187,213,472). Sobol et al. (473) avaient montré que cette hypersensibles des lignées murines *Polβ*$^{-/-}$ au MMS est due essentiellement à l'absence de l'activité 5'dRP lyase de la Polβ.

Cas du *Long-Patch Repair*

Les Polδ et ε sont les polymérases privilégiées dans le LPR (122,350,351,393) (voir (64)). Si elle est stimulée par FEN1, la Polβ peut aussi participer au LPR (102,128,160,415,474,534). Dans le cas du LPR l'intervention des ADN polymérases est précédée par le recrutement de la protéine homo-trimère PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). PCNA est recruté au niveau du site de la CSB grâce au facteur de réplication RFC (*Replication Factor C*) (126). Une fois recruté au site du dommage, la protéine PCNA forme un anneau coulissant autour de la double hélice de l'ADN et assure le recrutement des Polδ et ε qui à leur tour assurent la synthèse de 2 à 15 nucléotides (161,483). Cette synthèse déplace l'ancien simple-brin, situé en 5' de la CSB, de 2 à 15 nucléotides. Ces oligonucléotides déplacés sont appelés *Flap*. A ce moment, PCNA stimule l'activité d'une endonucléase spécifique, FEN1 (Flap endonucléase 1), qui procède au clivage du *Flap* (171). Il a été montré que FEN1 coopère avec PARP-1 et stimule le LP *gap filling* par la Polβ in vitro (416).

Le rôle précis de XRCC1 dans l'étape de remplissage de la brèche n'est pas encore clair. Il est vrai qu'elle interagit avec PCNA (146) et Polβ (67,268) mais il n'est pas clair si ces interactions ont un rôle dans le *gap filling*. On note que la perte de l'interaction entre XRCC1 et Polβ est accompagnée d'une légère sensitivité au MMS et à l'H_2O_2 (121,537).

1.4.3. Ligation de l'ADN

Il s'agit de la dernière étape du BER/SSBR. Cette étape consiste à relier l'extrémité 3' du nucléotide (oligonucléotide) néo-synthétisé à l'extrémité 5' de la CSB. Les protéines

spécifiques assurant cette ligation sont les ADN ligases. A ce jour, trois ligases ont été identifiées chez l'homme, les ligases I, III et IV (501). Seules la ligase I et la ligase III participent au BER et au SSBR. Les ADN ligase I et IIIα ont deux domaines catalytiques hautement conservés avec une forte homologie, qui agissent de la même manière sur l'ADN alors qu'elles ont des fonctions distinctes dans le SPR et le LPR (364). Ces fonctions distinctes peuvent être attribuées aux différents domaines liant les protéines partenaires : PBD (*Protein Binding Domain*) dans l'ADN ligase I liant PCNA et BRCT dans la ligase III liant XRCC1 (364).

Cas du *Short-Patch repair :*

L'ADN ligase III est majoritaire dans le SPR. Elle est présente sous deux isoformes appelées IIIα (103 KDa) et IIIβ (96 KDa) issues d'un épissage alternatif des transcrits d'ARN codant cette protéine (317). Les deux isoformes diffèrent uniquement par leur domaine C-terminal, dans lequel 77 aa de la ligase IIIα sont remplacés par 17 aa sans homologie de séquence dans l'isoforme ligase IIIβ (502). Seule la ligase IIIα participe au SPR, formant un complexe avec XRCC1 (68,69) et Pol β (535). Ces complexes jouent un rôle important dans le SPR (73,535,536). L'interaction XRCC1-ligase IIIα dépend d'un domaine BRCT localisé dans la partie C-terminal de la ligase (368). Cette interaction est nécessaire pour la réparation rapide par le BER, des dommages induits par le MMS (267,359,492). Dans les souris *XRCC1*$^{-/-}$, l'expression et l'activité de l'ADN ligase IIIα sont réduites de 6 à 10 fois, suggérant que la protéine XRCC1 a un rôle important dans la stabilisation de la ligase III α (69). En accord avec cette observation, le niveau d'activité de l'ADN ligase IIIα dans des cellules mutantes pour *XRCC1* (EM9) est restauré par transfection par l'ADNc codant pour XRCC1 (305).

Lors de ligations avortées par le complexe XRCC1-ligase IIIα au cours du SPR, des groupements adénylés peuvent être produits et liés covalemment aux extrémités 5' phosphates des CSBs. Dans ce cas intervient une autre protéine, l'aprataxine, qui est une hydrolase/transférase de nucléotides.

Cas du *Long-Patch Repair :*

Dans le cas du LPR, la religation est assurée par l'ADN ligase I (330,417,535) qui est recrutée au site du dommage grâce à l'interaction de son domaine N-terminal avec PCNA (74,287,358,364). L'ADN ligase I est nécessaire pour la réplication afin de religuer les fragments d'Okazaki (316), et est impliquée même dans la réparation par excision de nucléotide (229). Les souris KO (Knock Out) pour la ligase I ne sont pas viables (1).

2. Les autres voies de réparation des dommages de l'ADN

2.1. Voie de réparation par excision de nucléotide (NER)

La voie de réparation par excision de nucléotides (NER) est une voie extrêmement adaptable qui ne nécessite pas une série d'enzymes spécifiques de reconnaissance de la lésion proprement dite comme pour le BER mais est plutôt basée par la reconnaissance des déformations de l'ADN dues aux lésions et qui aboutit à l'excision de quelques nucléotides. De cette façon, cette voie de réparation peut réparer un grand nombre de dommages provoqués soit par des composés chimiques qui forment des adduits volumineux sur l'ADN ou par des agents de pontage, soit par des agents physiques tels que les rayons UV qui forment des dimères de pyrimidine cyclobutane ou des photos produits pyrimidine-6-4-pyrimidone (voir introduction générale § II.2.2) (553). Le NER répare également certaines lésions induites par les RI telles que les glycols de thymine. De plus, en absence de certaines glycosylases ou de MGMT, des lésions spécifiques de ces enzymes, sont réparées par le NER.

Le NER passe par cinq étapes différentes (Figure 7) : la reconnaissance du dommage, l'ouverture de la double hélice de l'ADN autour de la lésion, l'incision de l'oligonucléotide endommagé, la re-synthèse d'un nouveau oligonucléotide et enfin la ligation.
Il existe deux voies majoritaires dans le NER (Figure 7) : la réparation globale du génome (GGR : *Global Genome Repair*), qui opère sur la totalité du génome, et la réparation couplée à la transcription (TCR : *Transcription-Coupled Repair*), qui est spécifique des lésions situées sur les brins d'ADN transcrits et permet ainsi une réparation rapide des gènes actifs. Les seules différences entre ces deux voies sont dans l'étape de reconnaissance et dans la vitesse de réparation. Une troisième voie, appelée DAR (*transcription Domain-Associated Repair*) opérant sur les deux brins quand les gènes sont actifs a également été décrite (376,377).

L'importance fonctionnelle du NER est cliniquement attestée par l'existence de maladies liées à des défauts dans cette voie de réparation. Par exemple le *Xeroderma Pigmentosum* (XP), maladie rare due à des mutations invalidantes dans les gènes codant pour les protéines XP, est caractérisée par une hypersensibilité aux rayons UV et une prédisposition héréditaire aux cancers de la peau (89,90,284).

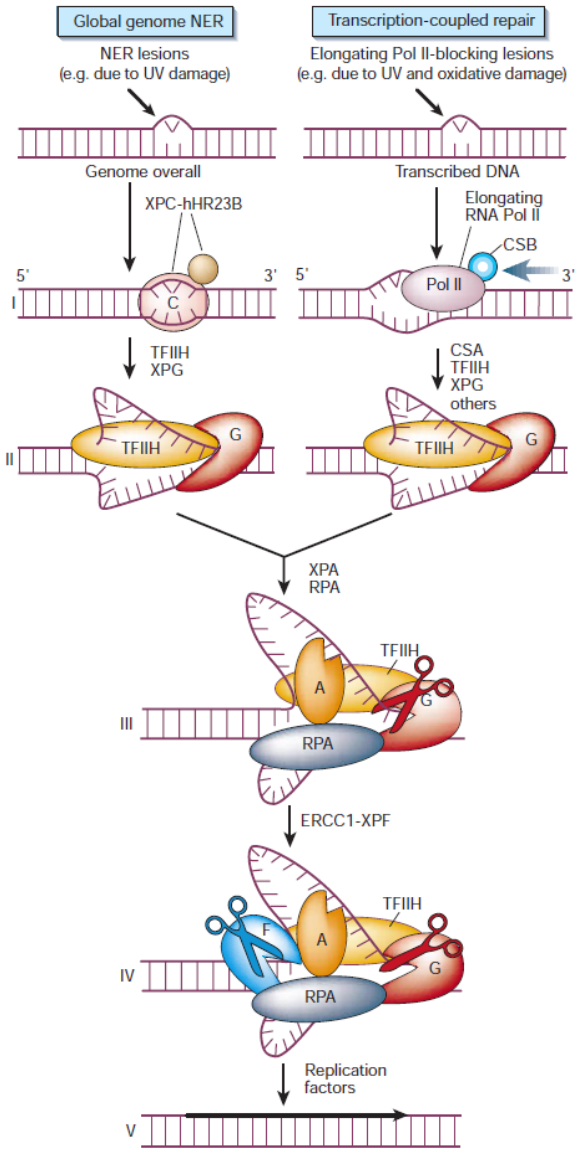


Figure 7: Schéma représentatif de la voie de réparation par excision de nucléotide (NER) : réparation globale du génome (GGR) et réparation couplée à la transcription (d'après Hoeijmakers (2001) (210)).

2.1.1. La réparation globale du génome (GGR)

Ce mécanisme de réparation commence par la reconnaissance des différentes distorsions de l'ADN par les complexes protéiques XPE-DDB1/2 (DDB : *Damaged DNA Binding protein 1 and 2*), XPC-HR23B et XPA-RPA (RPA : *Replication Protein A*). Le complexe XPE-DDB1/2 présente une forte affinité pour les photo-produits pyrimidine-6-4-pyrimidone lui permettant d'arriver rapidement au site du dommage et de favoriser ainsi le recrutement des deux autres complexes (269). La reconnaissance du dommage est suivie par le recrutement du facteur traductionnel TFIIH. Une fois recruté le complexe TFIIH permet le déroulement de l'hélice d'ADN autour du dommage grâce à ces deux sous unités XPB et XPD qui possèdent,

respectivement, une activité 3'→5' et 5'→3' hélicase. L'ADN ainsi ouvert va être stabilisé par la protéine RPA.

Le déroulement de l'ADN rend le simple-brin contenant la lésion accessible aux endonucléases XPG et XPF. XPG est recrutée en premier et coupe l'ADN simple-brin 5 à 6 nucléotides en aval du dommage. Puis vient le tour de XPF, accompagné d'ERCC1, qui coupe 20 à 22 nucléotides en amont du dommage. Un oligonucléotide d'une taille relativement constante (22 à 29 nucléotides) contenant le dommage est ainsi excisé (138).

Les protéines permettant la synthèse d'un nouvel oligonucléotide sont recrutées environ 30 min après la reconnaissance du dommage. PCNA est recrutée puis stabilisée au site de la lésion grâce à XPG et RPA. Une fois PCNA stabilisée, RPA et XPG quittent le site du dommage et laisse la place aux ADN polymérases Pol δ et ε qui vont combler la brèche de façon stable et fidèle. La ligation est assurée par la ligase I.

2.1.2. La réparation couplée à la transcription (TCR)

La TCR cible les lésions de l'ADN se trouvant sur des gènes activement transcrits. En effet, elle intervient lorsque le complexe de transcription de l'ADN en ARN se trouve bloqué au niveau d'une distorsion causée par un dommage photo-induit tel que les pyrimidine-6-4-pyrimidone (162). Dans ce cas, l'ARN polymérase II bloquée au niveau de la lésion recule d'une vingtaine de nucléotide et permet ainsi sa détection par les protéines CSA et CSB (*Cockayne Syndrome Protein A and B*) (293,442,518). Le recrutement de CSA et CSB permet alors la modification de la structure de la chromatine facilitant ainsi l'accès des autres facteurs du NER tel que TFIIH (163,370,442,518). En parallèle, le facteur d'élongation de la transcription TFIIS stimule l'activité le clivage du transcrit de l'ARN polymérase II bloqué (236). Cette dernière quitte donc le site du dommage et est ensuite dégradée.

Une fois la lésion reconnue, la réparation se poursuit comme pour le GGR. A la fin de la réparation, la transcription peut reprendre par le recrutement d'une nouvelle ARN polymérase II substituant celle qui avait été dégradée lors de la reconnaissance du dommage.

2.2. Voie de réparation des mésappariements de bases (MMR : *Mismatch Repair*)

La voie MMR est un système de correction des bases mal appariées. Contrairement aux systèmes d'excision de base et de nucléotide, le MMR reconnait des bases non endommagées qui sont appariées avec des bases non complémentaires (147,398). Ces mésappariements sont souvent des erreurs de réplication causées par les ADN polymérases telles que Pol δ et ε. Le MMR reconnait également de courtes insertions ou délétions de nucléotides qui forment des

boucles au sein de la molécule d'ADN. Ces insertions et délétions résultent de glissement pendant la recombinaison ou pendant la réplication de séquences génomiques répétitives (microsatellites).

Chez les mammifères le MMR implique plusieurs protéines et comporte quatre étapes principales (Figure 8) : la reconnaissance des bases mal appariées, l'identification du brin porteur du mésappariement, excision de l'oligonucléotide porteur du mésappariement, la re-synthèse et la ligation d'un nouvel oligonucléotide avec le bon appariement.

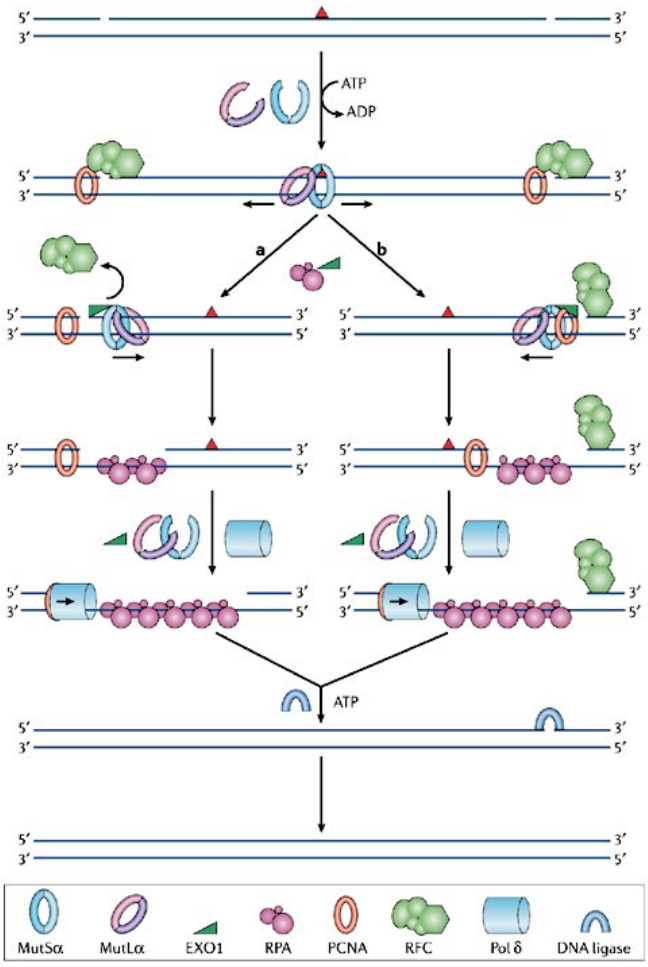


Figure 8 : Schéma représentatif de réparation des mésappariements de bases par la voie MMR (d'après Jiricny (2006) (229)).

L'étape de reconnaissance est assurée par deux complexes différents, hMutSα et hMutsβ. Le complexe hMutSα est composés des protéines hMSH2 et hMSH6 (*human MutS Homologous protein 2 and 6*) et reconnait spécifiquement les mésappariements de bases et les boucles formées par un seul nucléotide (174,234). Le complexe hMutsβ est composés des protéines hMSH2 et hMSH3 et reconnait seulement les boucles nucléotidiques issues de la délétion ou de l'insertion de plusieurs nucléotides (234,513).

En ce qui concerne l'identification du brin néosynthétisé porteur du mésappariement, le mécanisme adopté chez les mamifères reste à ce jour unconu. Lidentification du brin néosynthétisé est suivie par l'hydrolyse de l'ATP par MutSα provoquant un changement de la conformation de l'ADN et permettant ainsi le recrutement de l'hétéro-dimère MutLα composé des protéines hMLH1 (*human MutL homologous mismatch repair protein 1*) et PMS2 (*postmeiotic segregation increased 2*) (5). Si le complexe réplicatif est situé en 5' de mésappariement, MutSα et MutLα vont glisser en amont jusqu'à PCNA, déloger RFC et recruter l'exonucléase 1 (EXO1). Si le complexe réplicatif est situé en aval du mésappariement, les complexes MutSα et MutLα coulissent également jusqu'à PCNA, et recrute EXO1, tout en maintenant RFC sur le site du dommage pour éviter une dégradation de l'ADN.

L'exonucléase EXO1 intervient donc au niveau des deux excisions 5'→3' et 3'→5' (189,234). Une fois le brin excisé, RPA va stabiliser les extrémités en protégeant l'ADN simple-brin, puis la polymérase δ ou ε incorpore les nucléotides manquants à partir de l'extrémité 3'. Les cassures résiduelles restantes sont re-liguées par l'ADN ligase I (229).

Les mutations germinales dans les gènes hMSH2, hMLH1, hMSH6 et PMS2 créent des défauts du MMR et sont responsables de la plupart des cancers héréditaires colorectaux non polyposiques (398).

2.3. Voies de réparation des cassures doubles brins

Les cassures double-brin sont les dommages les plus critiques pour les cellules. Ce sont des lésions particulièrement importantes car quand elles ne sont pas réparées, elles sont létales, et quand elles sont mal réparées, elles peuvent provoquer des translocations chromosomiques ou une perte d'hétérozygotie. Leur réparation est donc indispensable pour la survie de la cellule. Les cellules de mammifères possèdent trois mécanismes principaux assurant la réparation des CDBs : la recombinaison homologue (HR : *Homologous Recombination*), la soudure simple de l'ADN (SSA : *Single Strand Annealing*) et la jonction des extrémités non homologues (NHEJ : *Non Homologous End Joining*).

2.3.1. Voie de réparation par recombinaison homologue (HR)

Parce qu'elle assure la conservation intégrale de l'information génétique, la recombinaison homologue est sans aucun doute le moyen le plus sécuritaire pour réparer les cassures double brin (réparation dite fidèle). Cette voie est utilisée préférentiellement chez les eucaryotes inférieurs (risque de translocations chromosomiques dans les eucaryotes supérieurs

lié à la présence de séquences répétées) (301) (pour revue voir (422)). Chez les mammifères elle est strictement régulée et dépend du cycle cellulaire, elle se produit principalement en phase S/G2 et préférentiellement en phase S (236,499) (pour revue voir (422)). Elle utilise l'information codante portée par la chromatide sœur intacte correspondant à la partie endommagée.

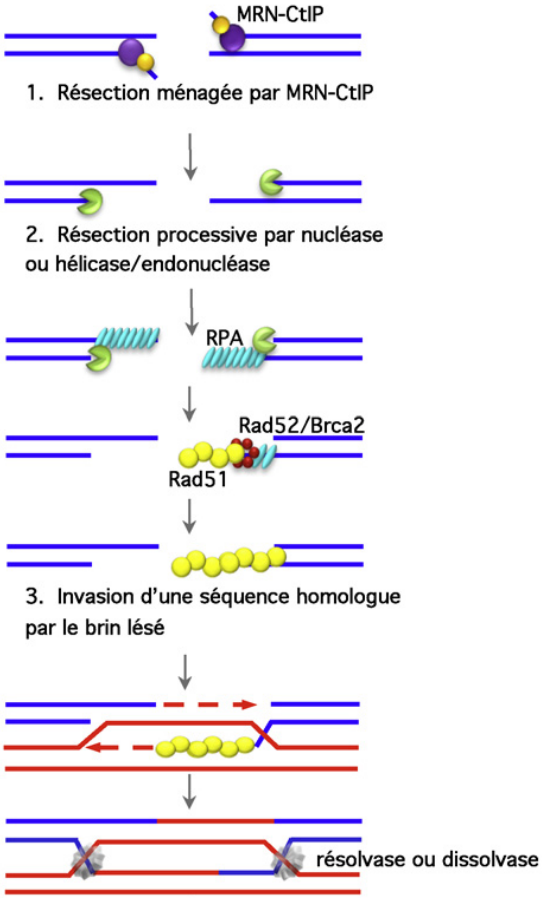


Figure 9 : Schéma représentatif de la réparation des CDBs par recombinaison homologue (HR) (d'après Rass E. et al. (2011) (422)).

La première réponse aux CDBs est leur détection par le complexe protéique Mre11-Rad50-Nbs1/Xrs2-CtIP (complexe MRN-CtIP) responsable du recrutement des protéines de signalisation ATM (*Ataxia Telangectasia Mutated*) et ATR (*AT Related*) (75). Les kinases ATM et ATR permettent l'activation par phosphorylation du complexe MRN (278,279,402), qui, via l'activité 5'→3' exonucléasique de Mre11, va digérer partiellement les extrémités 5' pour donner des extrémités 3' sortantes (99), intermédiaires obligatoires pour initier la recombinaison homologue. L'extrémité 3' sortante attire les protéines RPA et Rad52 qui la protègent contre une dégradation par les exonucléases cellulaires permettant le recrutement de la protéine Rad51. Le recouvrement de l'extrémité 3' par RPA facilite la polymérisation de Rad51 sur l'ADN simple brin. Les deux protéines Rad51 et Rad52 vont ensuite rechercher

une séquence homologue dans l'ADN intact par envahissement d'une région double-brin homologue d'une chromatide sœur ou d'un chromosome homologue. D'autres partenaires tels que les paralogues de Rad51 (Rad51B, Rad51C, Rad51D) et les protéines Rad54, XRCC2, XRCC3, DMC1, BRCA1 et BRCA2 sont recrutés et assistent Rad51 dans les différentes étapes de la HR. L'une des extrémités 3' effectue l'invasion du duplex d'ADN partenaire en déplaçant le brin complémentaire (boucle D) et est élonguée par l'ADN polymérase Polη (244) et/ou Polδ (321) utilisant comme matrice la séquence homologue appropriée. La boucle s'agrandit suffisamment et migre via l'activité hélicase d'une protéine de la famille RUVB-*Like* pour que le second fragment 3' puisse s'hybrider et être polymériser à son tour, formant alors des jonctions de Holliday. Les hélicases Werner (WRN) et Bloom (BLM) interviennent également pour ouvrir la chromatine et permettre l'invasion réciproque des brins (210). Les jonctions de Holliday seront ensuite résolues par des endonucléases appelées résolvases, telles que MUS81 et MMS4 chez l'homme (334). Une fois les jonctions résolues, les brins nouvellement synthétisés sont ligués par l'ADN ligase I.

Plusieurs maladies sont liées au dysfonctionnement de la HR dues à des mutations des gènes codant pour des protéines impliquées dans cette voie de réparation. En effet, chez l'homme les mutations dans les gènes *MRE11* et *NBS1* sont associées au syndrome de *Nijmegen* (NBS : *Nigmegen Breakage Syndrome*) (458). Ce syndrome partage plusieurs caractéristiques avec l'*ataxie télangiectasie* (AT) qui est associée à une mutation du gène *ATM*, en particulier l'hypersensibilité aux RI, la fréquence d'aberrations chromosomiques élevés et la prédisposition au cancer (86,158,159,481). De la même manière, les mutations hétérozygotes affectant les gènes *BRCA1* et *BRCA2* constituent aussi un facteur de prédisposition aux cancers du sein ou des ovaires.

2.3.2. Voie de réparation par Single-Strand Annealing (SSA)

Ce mécanisme répare les CDBs produites au niveau des régions répétitives. En effet il est basé sur l'hybridation de deux petites séquences homologues (micro-homologies), situées dans les deux extrémités 3' de la CDBs, après délétion par excision exonucléasique des extrémités non complémentaires. Le SSA peut être considéré comme une variante de la HR parce que l'initiation des deux voies est identique avec plusieurs effecteurs communs. Cependant l'élimination des extrémités non complémentaires rend le SSA, contrairement à la HR, un mécanisme de réparation infidèle (192).

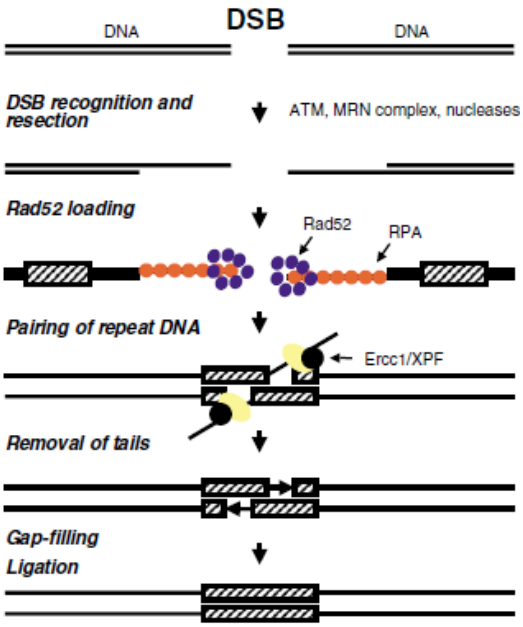


Figure 10 : Schéma représentatif de réparation des CDBs par la voie du *Single Strand Annealing* (d'après Valérie et Povirk (515)).

Après détection de la CDB par le complexe MRN et la protéine ATM, les extrémités non complémentaires subissent une digestion enzymatique grâce à l'activité exonucléase 5'→3' de la protéine Mre11, générant ainsi des extrémités simple-brin sortantes en 3'. Cette activité s'arrête en présence de séquences répétées qui peuvent s'apparier par complémentarité de bases (515). Dans le complexe MRN, Rad50 possède une activité ATPasique qui pourrait faciliter le déroulement de l'ADN rendant la lésion accessible aux protéines de la réparation (397). La sous unité Nbs1 semble, pour sa part, impliquée dans le transport nucléaire du complexe MRN et la transduction et l'amplification du signal de CDBs entre les protéines senseurs des dommages de l'ADN (principalement la kinase ATM) et le complexe MRN (116,173,296,540).

Comme dans la HR, après résection de la CDB par le complexe MRN, la protéine RPA se fixe sur les fragments d'ADN simple-brin sortant en 3' afin de les protéger des nucléases. La protéine Rad52 se fixe ensuite aux extrémités, permettant leur rapprochement. Les protéines du NER, ERCC1 et XPF, interviennent ensuite pour exciser les oligonucléotides 3' sortants. La brèche entre les extrémités est comblée par une polymérase avant d'être soudées par une ADN ligase telle que la ligase I (515).

2.3.3. Voie de réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ)

Chez les eucaryotes supérieurs, cette voie de réparation est prédominante et peut intervenir dans toutes les phases du cycle cellulaire. Appelée aussi la voie non fidèle, parce

qu'elle peut entraîner des délétions de séquences après action de certaines nucléases. La voie NHEJ consiste à joindre, par ligation, les extrémités de la CDB de manière séquence indépendante. Donc, contrairement au SSA, ce mécanisme ne nécessite pas la présence de séquences répétitives. Le NHEJ se compose de deux voies : Le C-NHEJ (NHEJ canonique) dépendant de la protéine DNA-PK et le A-NHEJ (*Back-up/alternative NHEJ*), indépendant de la protéine DNA-PK.

2.3.3.1. Le C-NHEJ

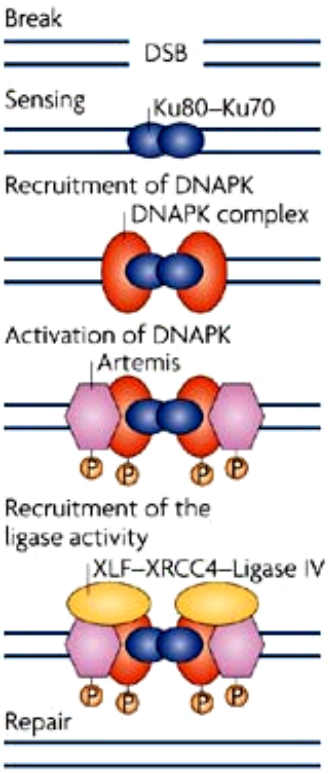


Figure 11 : Schéma représentatif de la réparation des CDBs par la voie du NHEJ (d'après Misteli et Soutoglou (352)).

Plusieurs protéines sont impliquées dans le processus du C-NHEJ (Figure11), les protéines essentielles assurant les étapes de base sont:

- le complexe (Ku70/80) qui interagit avec les extrémités de l'ADN,
- la sous-unité catalytique de la kinase dépendante de l'ADN (DNA-PKcs) qui signale la présence des CDBs et recrute ou/et active par phosphorylation les protéines de réparation. Parmi les protéines phosphorylées on mentionnera P53, Ku et DNA-PKcs elle-même ;
- l'enzyme Artémis responsable du traitement des extrémités complexes, non canoniques, non directement ligables.

- et enfin le complexe effecteur ADN ligase IV/XRCC4 pour religuer les extrémités des cassures (Burma et al. 2006). La localisation de ce complexe au site de la CDB est assurée par la protéine XLF (*XRCC4-Like Factor*), appelée aussi Cernunnos (70).

La nature des protéines recrutées diffère selon le type de CDBs, simples (directement ligables) ou complexes (nécessitent une préparation supplémentaire) (324).

On constate que le C-NHEJ intervient aussi dans la recombinaison V(D)J des gènes V (Variable), D (Diversity) et J (Joining) codant les immunoglobulines et les récepteurs des lymphocytes T. Ces gènes codant subissent des CDBs qui sont induites par le complexe RAG (constitué des enzymes RAG1 et RAG2 associées à HMG1). Ces CDBs sont protégées contres les exonucléases par leur transformation en épingle à cheveux (4) dont l'ouverture est assurée par Artémis (315). Les différentes extrémités double-brin issues des trois gènes sont ensuite reliées entre elles par le C-NHEJ (420). Ce processus assure la génération d'une grande variété de séquences protéiques de reconnaissance des antigènes, à partir des trois gènes V, D et J et assure ainsi la poly-clonogénicité pour un système immunitaire efficace. Des mutations dans des gènes codant les protéines impliquées dans le NHEJ, notamment Artemis et Ligase IV, sont responsables d'importants déficits immunitaires (294) et prédisposent à l'apparition de lymphomes et de leucémies (382).

2.3.3.2. Le A-NHEJ

Des études, *in vitro*, basées sur l'utilisation des extraits cellulaires et des plasmides linéarisés par des enzymes de restriction, faisant office de substrats des systèmes de réparation des CDBs, ont permis de mettre en évidence l'existence d'un NHEJ indépendant de la protéine DNA-PK (82,153,230,271). Wang et al. ont montré en 2001 (526), que les cellules dépourvues de DNA-PKcs ou de la ligase IV présentaient une activité de ligation qui leur permettait de réparer les CDBs par une voie alternative indépendante de Ku, 20 à 30 fois plus lente que le NHEJ canonique. Par la suite, il a été rapporté que cette voie alternative est dépendante de quatre protéines principales impliqués dans le BER/SSBR : PARP-1, XRCC1, ligase III et PNK (19,20,527).

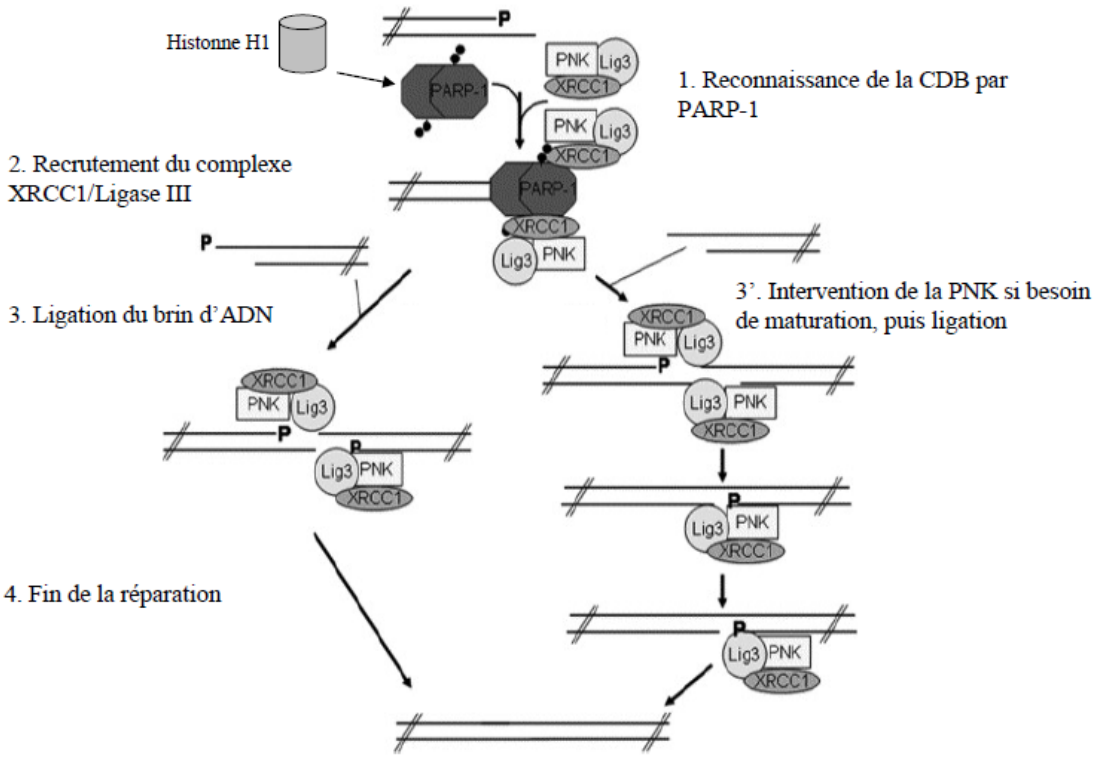


Figure 12 : Schéma représentatif de la réparation de CDBs par la voie du A-NHEJ (d'après Audebert et al. (2006) (20) et Rosidi et al. (2008) (437)).

Cette voie est initiée par le recrutement et l'homo-dimérisation de PARP-1 au site de la CDB (Figure 12). Cette homo-dimérisation permettrait le rapprochement et la stabilisation des deux extrémités 5' et 3' de la cassure. Une fois recruté au site de la cassure, PARP-1 devient active et recrute par poly(ADP-ribose)ylation les protéines XRCC1, ligase III et PNK. PNK phosphoryle ensuite l'extrémité 5' permettant ainsi la ligation de la CDB par la ligase III (20).

Les partenaires du SPR ne prendraient donc pas uniquement en charge la réparation des CSB, mais pourraient également pallier les déficiences du NHEJ canonique dans la réparation des CDBs. Toutefois, la suppression de PARP-1 n'a pas d'incidence sur la vitesse de réparation des CDB ni sur la survie des cellules exposées à la NCS, un inducteur de cassures double-brin de l'ADN (374).

En 2008, l'équipe d'Iliakis G. a (437) mis en évidence l'implication d'un nouveau facteur, l'histone H1, dans cette voie alternative. Il a été montré que H1 favorise la réparation des CDBs par le A-NHEJ en augmentant l'activité de PARP-1 et en stimulant l'activité de ligation de la ligase III, tout en neutralisant la voie canonique (437). Cette découverte indique que les facteurs chromatiniens et de remodelage de la structure chromatinienne pourraient également avoir un rôle dans le choix de la voie de réparation des CDBs.

IV. Modifications post-traductionnelles des protéines

Après leur traduction, la plupart des protéines sont modifiées de façon covalente et réversible. Les protéines ainsi modifiées adoptent des structures et ont des propriétés physicochimiques très différentes des molécules directement codées par les gènes. Ces modifications post-traductionnelles jouent un rôle important dans la régulation des fonctions de ces protéines. Elles contrôlent également leur stabilité, leur localisation intracellulaire et plus spécifiquement leurs activités intrinsèques et/ou leur interaction avec d'autres protéines ou la molécule d'ADN, les intégrant ainsi dans différents processus cellulaires dont la signalisation des dommages de l'ADN et les mécanismes de réparation. Les modifications post-traductionnelles des protéines sont nombreuses : l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la SUMOylation, la poly(ADP-ribose)ylation, la phosphorylation, la biotinylation, la carboxylation, l'hydroxylation, l'amidation et la sulfatation. Ces modifications impliquent différents acides aminés : l'acétylation et l'ubiquitination des lysines, la méthylation des lysines et des arginines, la SUMOylation et la poly(ADP-ribose)ylation des arginines et des glutamates, et la phosphorylation des sérines et des thréonines. Nous n'exposerons dans ce travail que les modifications par poly(ADP-ribose)ylation par la famille des PARPs et par phosphorylation, en particulier par la kinase Cdk5 (*Cyclin-Dependent Kinase 5*).

1. La poly(ADP-ribose)ylation.

La modification post-traductionnelle par poly(ADP-ribose)ylation (Figure 13) est la catalyse des liaisons covalentes entre les unités ADP-ribose, issues de l'hydrolyse du NAD^+, et les résidus arginines et glutamates des protéines acceptrices. Cette réaction enzymatique libère, pour chaque molécule de NAD^+ hydrolysée, une molécule de nicotinamide (Nam) et un proton. La poly(ADP-ribose)ylation est initiée par la formation d'une liaison ester entre l'acide aminé accepteur et le premier résidu d'ADP-ribose. La liaison du premier ADP-ribose est ensuite suivi par la formation et l'élongation de la chaine de polymère (PAR : Poly(ADP-ribose)), linéaire ou ramifiée, dont la structure est hélicoïdale. Les résidus ADP-ribose sont greffés sur le 2'-OH du ribose de l'adénine (dans le cas d'élongation linéaire) ou du ribose du Nam (dans le cas des ramifications) grâce à la catalyse de liaisons glycosisidiques ribose-ribose 1'-2' (452). La ramification commence au-delà de 20 unités, elle est reproduite à des distances régulières de 40 à 50 unités.

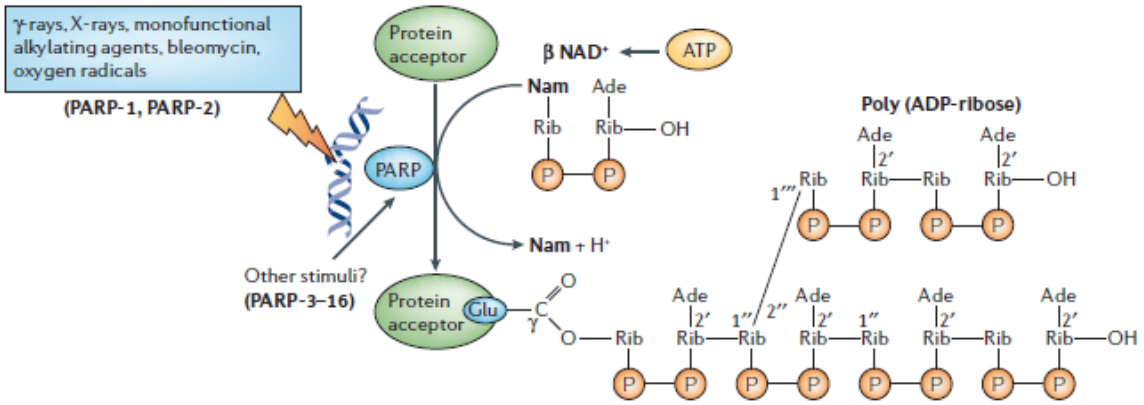


Figure 13 : Schéma représentatif de la poly(ADP-ribose)ylation en réponse aux CSBs induites par différent agents génotoxiques (d'après Schreiber et al. (2006) (452)).

Dans des conditions cellulaires physiologiques et en absence de stimulation, le taux des PAR constitutif est bas et les polymères sont courts (32). Cependant, sous conditions de stress cellulaire, tel que la présence de dommages de l'ADN, le niveau des PAR peut être augmenté d'un facteur de 10 à 500 et leur longueur peut atteindre jusqu'à 200 résidus (464,466). Les PAR sont impliqués dans la signalisation et la régulation de nombreux processus cellulaires, en particulier ceux qui impliquent le métabolisme de l'ADN. De façon générale, ils modulent les fonctions des protéines en régulant leurs activités enzymatiques et/ou leurs interactions avec d'autres protéines ou avec la molécule de l'ADN. Ainsi, les PAR participent dans la régulation de la réplication et de la transcription, l'homéostasie des télomères, la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN, et le remodelage de la structure chromatinienne (voir (196,215,264)). On notera que les PAR sont impliqués aussi dans la régulation de la division, la prolifération et la progression du cycle cellulaire (voir (196,215,264)). De plus, les PAR peuvent induire la mort cellulaire via l'apoptose, par induction de la translocation du facteur AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) des mitochondries vers le noyau, ou via la nécrose par épuisement des NAD^+, une des principales sources énergétique de la cellule (92,196).

1.1. Les poly(ADP-riboses)polymérases (PARPs)

La synthèse des PAR est catalysée par les PARPs. Ces protéines peuvent poly(ADP-ribose)yler plusieurs protéines cibles y compris elles-mêmes (auto-modification). Les PARPs constituent une superfamille composée, actuellement, de 17 protéines (Figure 14) (13,452), identifiées par des recherches d'homologie avec le domaine catalytique de PARP-1. Le domaine protéique sur lequel ont été basées les études d'homologie est dit « signature de PARP ». Cette signature est constituée d'une séquence d'acides aminés contenue dans le domaine catalytique des PARPs, et a été définie à partir du repliement β-α-loop-β-α NAD^+ de

PARP-1. Ce domaine forme la séquence la mieux conservée dans les orthologues de PARP-1. Il est localisé dans la région C-terminale des protéines, sauf dans PARP-4/vPARP.

En plus du domaine catalytique, les PARP contiennent typiquement un ou plusieurs motifs ou domaines supplémentaires, y compris des domaines « doigts de zinc », des motifs BRCT (*BRCA1 C-terminus-like*), des répétitions ankyrin, des macro domaines et des domaines WWE et DBD (*DNA Binding Domaine*) (Figure 14). Ces différents domaines sont responsables des interactions des PARP avec l'ADN, l'ARN et d'autres protéines. La différence et la multiplicité de ces domaines donne ainsi à chaque PARP des propriétés spécifiques.

Bien que le domaine catalytique soit très conservé dans la famille PARP, certaines PARPs ne synthétisent que des mono(ADP-ribose) (PARP-10) et d'autres ne sont capables de synthétiser ni des mono(ADP-ribose) ni des PAR (PARP-9/BAL1) (88). Le domaine catalytique de PARP1 contient trois résidus cruciaux : une histidine et une tyrosine, importants pour lier le NAD^+ et un glutamate (Glu 988) qui est essentiel pour l'activité polymérase. Selon les propriétés structurelles des domaines catalytiques des PARPs, il semble que seulement six d'entre eux (PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4, tankyrase-1 et 2) peuvent synthétiser des PAR, tandis que le reste ne sont probablement que des mono-ADP-ribosyle-transférases (203,252). En effet, la présence d'isoleucine, leucine ou tyrosine en place de ce glutamate dans les PARPs 6 à 16 serait plutôt en faveur d'une activité mono-ADP-ribosyle-transférases (252). Cependant, jusqu'à aujourd'hui, le seul moyen fiable de déterminer si une PARP est réellement une mono ou poly(ADP-ribose) polymérase est d'analyser le produit de sa catalyse (10). Basé sur ce critère, PARP-1, PARP-2 et tankyrase-1 sont de vrais PARPs. Chez l'homme et la souris, les PARP-1 et PARP-2 peuvent synthétiser des PAR branchés (10,12), alors que la tankyrase-1 humaine ne synthétise que des PAR linéaires (430). La caractérisation partielle de la tankyrase-2 laisserait supposer qu'elle produise également des PAR (449). Pour PARP-3 des études récentes montrent qu'elle a une activité poly(ADP-ribosyle) transférase (41,441)

En fonction des domaines fonctionnels ou de la fonction connue de chaque PARP, cette superfamille est divisée en : PARPs dépendantes de l'ADN (PARP-1, PARP-2, et PARP-3), tankyrases, PARPs à doigt de zinc de type CCCH, et macro-PARPs (Figure 14). A ce jour, PARP-1 et PARP-2 et PARP-3 sont connues pour être fortement stimulés par des dommages à l'ADN. Cependant, d'autres travaux ont montré que PARP-1 pourrait être activé également par des structures particulières de l'ADN, comme les épingles à cheveux ou l'ADN surenroulé

(251,307). Peu de données existent sur les modes d'activation et de régulation des autres PARPs.

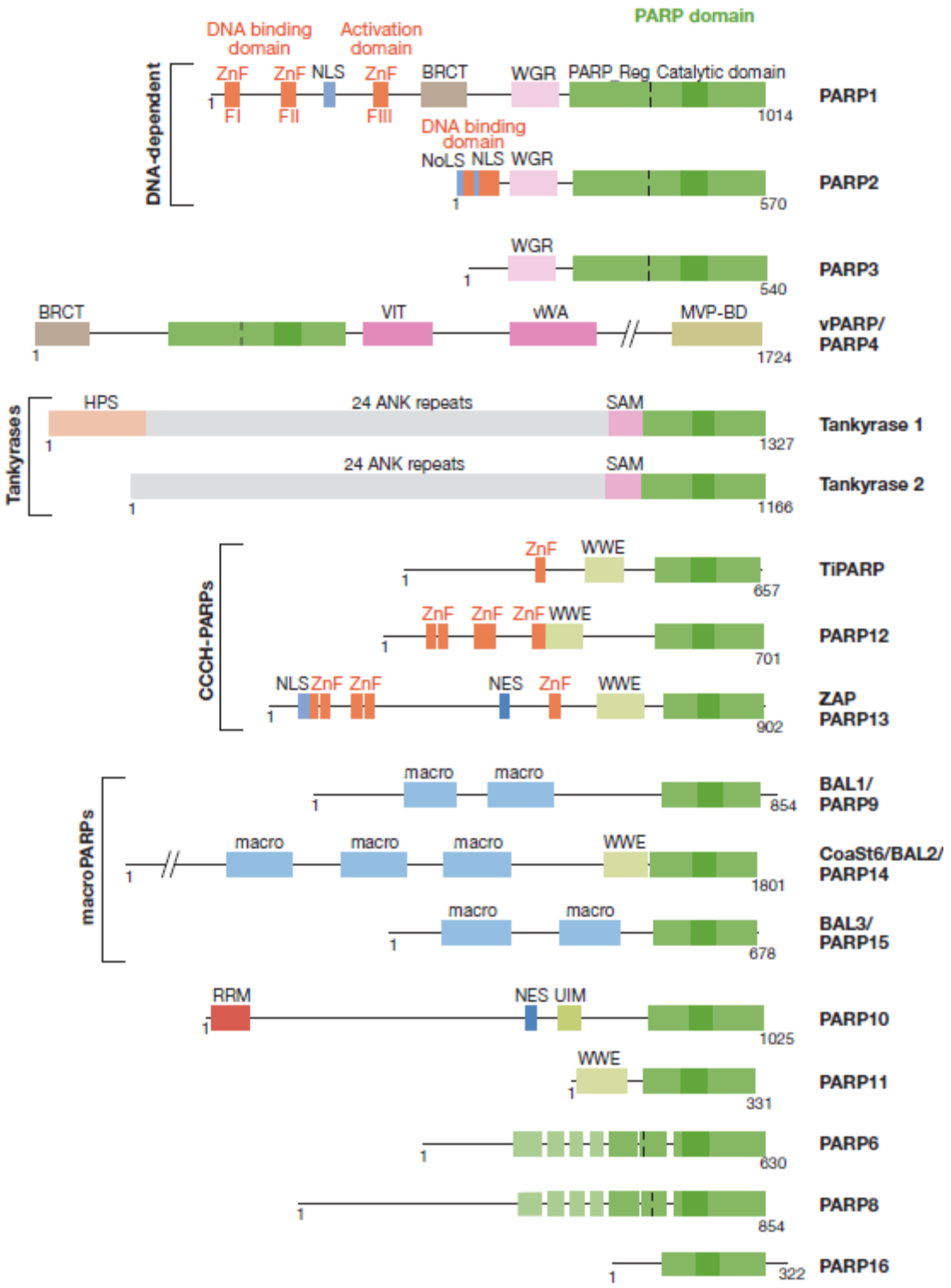


Figure 14 : Schéma représentatif des 17 membres de la famille PARP et de leurs domaines architecturaux (d'après Hakmé et al. (2008) (196)).

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes PARP humaines (d'après Amé, JC et al. (2004) (13) et Schreiber V. et al. (2006) (452)).

Nomenclature proposée	Masse moléculaire (Da)	Nombre d'acide aminés	Localisation chromosomique du gène	% d'identité*	% d'homologie *
hPARP-1	113 083	1014	1q41-42	100	100
hPARP-2	64 819	570	14q11.2	46	69
hPARP-3	60 088	533	3p21	39	61
hPARP-4 (VPARP)	192 672	1724	13q11	34	54
hPARP-5a (tankyrase 1)	142 011	1327	8p23.1	38	52
hPARP-5b (tabkyrase 2)	126 917	1166	10q23.3	34	54
hPARP-6	71 144	630	15q22.3	29	51
hPARP-7 (tiPARP)	78 926	680	3q25.31	26	50
hPARP-8	55 824	501	5q11.2	25	48
hPARP-9 (Bal)	96 282	854	3q13-q21	27	57
hPARP-10	109 327	1020	8q24.3	28	47
hPARP-11	38 738	331	12p13.3	35	58
hPARP-12	79 063	701	7q34	33	54
hPARP-13		902			
hPARP-14	170 600	1518	3q21.1	30	47
HparP-15	111 765	989	3q21.1	22	41
HparP-16	36382	322	15q22.2	21	32

*Par rapport au domaine catalytique de PARP-1

1.1.1. La poly(ADP-ribose)polymérase 1 (PARP-1)

PARP-1 a été identifiée pour la première fois en 1963 par Chambon et al. (79). C'est une protéine de 113 kDa codée par un gène de 23 exons situé dans la région q41-42 du chromosome 1 (109). PARP-1 est le membre fondateur de toute la famille PARP et est la plus abondante, avec une moyenne de 1 million de molécules par cellule. Elle représente la deuxième protéine la plus abondante après les histones. La majorité des PAR formés dans la cellule (environ 85 %) sont synthétisés par PARP-1 (12).

1.1.1.1. Structure et fonctions de PARP-1

Structure :

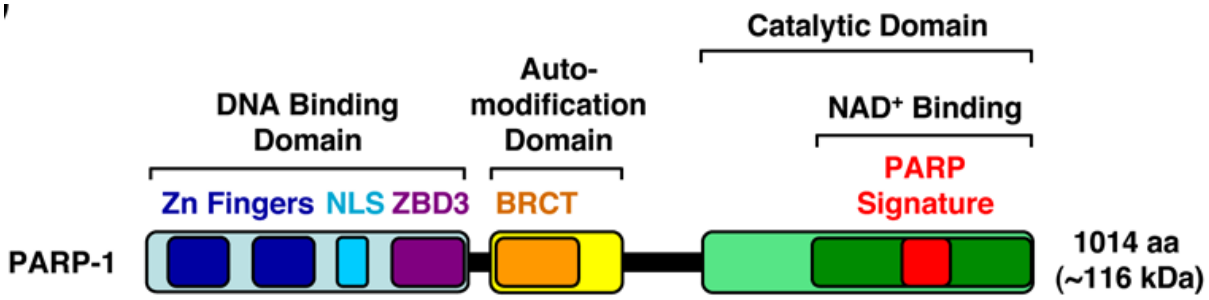


Figure 15 : Schéma représentatif des différents domaines de PARP-1. (D'après Kraus (2008) (264)).

PARP-1 est une protéine modulaire composée de 1014 acides aminés. Selon la relation structure-fonction, PARP-1 est composée de trois domaines majeurs : le domaine de liaison à l'ADN (DBD : *DNA Binding Domain*), le domaine d'auto-modification (AMD : *Auto-Modification Domain*) et le domaine catalytique. Chaque domaine contient plusieurs motifs spécifiques.

Le domaine DBD est situé dans sa région N-terminale entre les acides aminés 1 et 372. Ce domaine contient deux motifs de doigt de zinc (FI et FII) de type $CX_2CX_{28,30}HX_2C$. Ces deux motifs à doigt de zinc ont un rôle très important dans la régulation de l'affinité de toute la protéine à l'ADN. En effet, ils ne sont pas spécifiques de séquences nucléotidiques (184,444) et reconnaissent les lésions de l'ADN et autres structures inhabituelles telles que les épingles à cheveux (184,307,404). Récemment, un troisième motif à doigt de zinc (FIII) a été identifié dans la PARP-1 humaine (274,490). Bien que ce motif ne lie pas l'ADN, il est nécessaire pour stimuler l'activité de PARP-1 (490). Il serait responsable de la communication entre les régions N-terminale et C-terminale qui régule l'activation dépendante de l'ADN de PARP-1 (274,295). En plus des motifs à doigt de zinc, le domaine DBD contient une séquence, qui permet la localisation nucléaire de PARP-1, dite NLS (*Nuclear Localisation Sequence*), et une séquence consensus (DXXD) de clivage par la caspase 3.

Le domaine AMD est situé entre les acides aminés 372 et 524 de la protéine et contient un sous domaine E contenant les résidus Glu, cibles de l'auto-modification. L'AMD contient également un domaine BRCT responsable des interactions protéine-protéine permettant ainsi à PARP-1 une interaction directe avec la majorité de ses partenaires y compris elle-même (538).

Le domaine catalytique dit domaine F contient la signature PARP (entre les résidus 858 et 908) et est situé dans la région C-terminale entre les acides aminés 524 et 1014

(235,440,538). Ce domaine identifié par cristallographie (440) est bien conservé dans toutes les PARPs, des plantes à l'homme (109,521). Il peut être réduit à un polypeptide C-terminal de 40 kDa sans perte de l'activité catalytique (109,521).

Fonctions de PARP-1:

PARP-1 est une molécule multifonctionnelle dont l'activité catalytique est impliquée dans de divers processus cellulaires : la réplication, la transcription, la mort cellulaire, la régulation de la division cellulaire par poly(ADP-ribosyl)ation des protéines des kinéttochores CENPA/B et BUB3, le contrôle du stresse oxidatif via la régulation de l'expression des NO synthases (NOS), et le maintien de l'intégrité chromatinienne et génomique par remodelage de la chromatine et signalisation/réparation des dommages de l'ADN.

En réplication, il a été montré que PARP-1 est un composant du synthésome MRC (Multiprotein DNA Replication Complex) (461). En effet, elle poly(ADP-ribose)yle environ 15 des 40 composants de ce complexe, tels que les ADN polymérasesα et ε (232,462) et interagit avec le complexe ADN polyméraseα -primase (463) et l'ADN ligase I (97). De plus, PARP-1 est impliquée dans le redémarrage des fourches de réplication après lésion de l'ADN (545).

PARP-1 participe, également, de façon directe à la régulation transcriptionnelle en interagissant directement avec certains facteurs et cofacteurs de la transcription. L'exemple le plus connu est l'interaction de PARP-1 avec NF-κB, un facteur de transcription qui régule les gènes des réponses immunes et inflammatoires (202,388). On note que PARP-1 peut aussi intervenir dans la régulation de la transcription de façon indirecte. En effet, la relaxation de la chromatine initiée par PARP-1 (Introduction générale § IV.1.4.) permet à des facteurs de transcription d'avoir accès aux sites promoteurs des gènes, permettant ainsi l'activation de la transcription.

PARP-1 est également impliquée dans les mécanismes de l'apoptose caspase-indépendant. Elle déclenche la relocalisation du facteur pro-apoptotique AIF de la mitochondrie vers le noyau (256). En 2005, Koh et al. (257) ont démontré que cette relocalisation est PAR dépendante. D'autre part, l'hyper-activation de PARP-1 en réponse à un stress génotoxique aigu conduit, par consommation de la totalité des NAD^+, à l'épuisement du pool énergétique de la cellule entrainant sa mort par nécrose. Ce phénomène est exploité cliniquement, par inhibition de l'activité PARP, pour prévenir les accidents nécrotiques en situation d'hypoxie-reperfusion ou de choc septique (119,238,332,546).

1.1.1.2. Rôles de PARP-1 dans la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN

Le premier rôle attribué à PARP-1 a été dans le maintien de la stabilité génomique. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas clairs, il est bien connu que PARP-1 joue un rôle majeur dans la signalisation et la réparation des lésions d'ADN.

Initialement, PARP-1 a été décrite comme un acteur essentiel du système de réparation par excision de bases et des cassures simple-brin. PARP-1 agit en tant que senseur moléculaire des cassures de l'ADN et signale leur présence aux différents effecteurs de la réparation (9), ainsi PARP-1 jouerait un rôle clé dans l'organisation spatio-temporelle de leur réparation. PARP-1 se fixe très rapidement sur les CSBs sous forme de dimère, grâce à la très forte affinité des deux doigts de zinc du domaine DBD pour ces lésions. La fixation du dimère de PARP-1 stimule son activité catalytique de plus de 500 fois (465). Parmi les principales cibles de cette activité catalytique sont PARP-1 lui-même, les histones H1 et H2B, les topoisomérases I et II, les ADN hélicases. Lors de l'auto-(ADP-ribose)ylation de PARP-1, la grande accumulation de charges négatives dues à la présence des polymères conduit par répulsion de charges à la dissociation de PARP-1 de l'ADN (195,328,362,445,471,550). Ce cycle d'association-dissociation peut être répété plusieurs fois dans le but de protéger les extrémités des CSBs (195). Ensemble, l'auto-modification de PARP-1 et l'hétéro-modification des histones entrainent la relaxation de la chromatine au voisinage de la lésion permettant ainsi un accès au site endommagé des protéines du BER/SSBR (136,318,320,386,406,426). Le premier partenaire du BER recruté par PARP-1 auto-modifiée est la protéine XRCC1 (voir Introduction générale § III.1.3). En plus de son rôle dans le BER/SSBR, PARP-1 est impliquée dans d'autres mécanismes de réparation des dommages de l'ADN, notamment dans la réparation des CDBs en intervenant dans la voie par Recombinaison Homologue (HR) (Figure 16) (voir introduction générale § III.2.3.1). Actuellement, il est connu que l'absence d'activité de PARP-1 affecte les cinétiques de recrutement de MRE11, NBS1 au site de la CDB (195). Parallèlement à son implication dans la HR, PARP-1 est l'un des partenaires du NHEJ alternative (A-NHEJ) (voir introduction générale § III.2.3.1). D'autre part PARP-1 est capable de former un complexe avec ATM, acteur majeur de la signalisation des CDBs, en réponse aux RI (2).

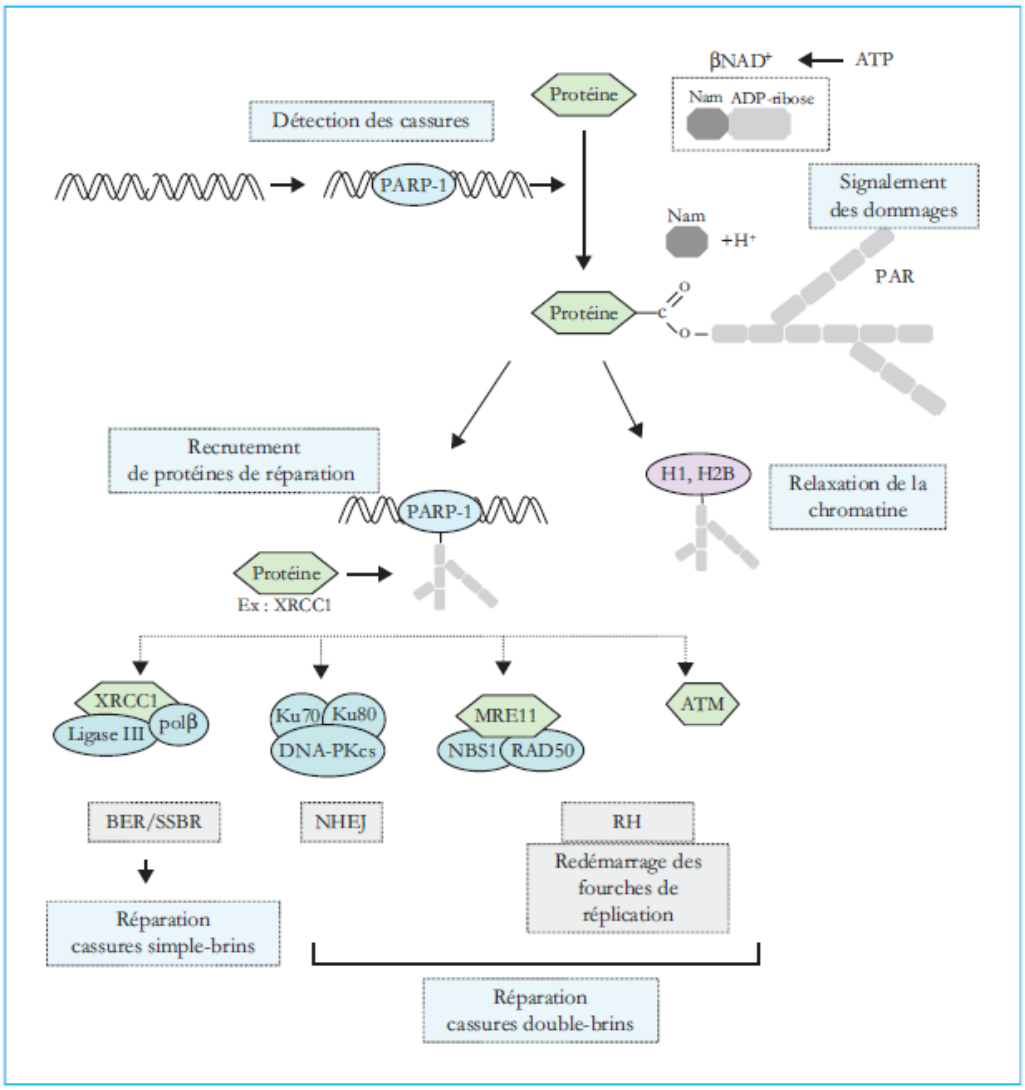


Figure 16 : Rôle de PARP-1 dans la réponse aux dommages de l'ADN (d'après Dantzer et al. (2011) (105)) : PARP-1 détecte les cassures puis catalyse la synthèse des PAR signalant ainsi la présence des dommages. L'auto-modification de PARP-1 permet le recrutement des protéines de réparations sur le site des dommages. La poly(ADP-ribosyl)ation des protéines composant les complexes de réparation régule les processus de réparation mis en jeu. La poly(ADP-ribosyl)ation des histones permet l'ouverture de la structure de la chromatine.

Bien que PARP-1 soit impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN, la viabilité et la fertilité des souris KO Parp-1$^{-/-}$ suggère que l'absence de cette protéine n'est pas nécessaire pour la viabilité. Cependant, l'hypersensibilité de ces souris, de leurs cellules et les cellules humaines dépourvues de PARP-1 aux RI et aux agents alkylants tels que le MNNG, le MNU et le MMS (454) prouve bien le rôle majeur de PARP-1 en présence d'un stress génotoxique.

1.1.2. La poly(ADP-ribose)polymérase 2 (PARP-2)

En 1998, Shieh et al. avaient montré que les cellules fibroblastes issues de souris invalidées pour PARP-1 étaient capable de synthétiser des PAR, suggérant l'existence d'une autre PARP (457). Une année après cette observation, PARP-2 a été caractérisée. Son activité de poly(ADP-ribose)ylation correspond à environ 10 à 15% de l'activité totale de la cellule (12). La PARP-2 humaine est une protéine de 62 kDa codée par un gène unique de 16 exons situé dans la région q11.2 du chromosome 14. Le gène codant la PARP-2 chez les souris est situé en position 14 C1 (516).

1.1.2.1. Structure et fonctions de PARP-2

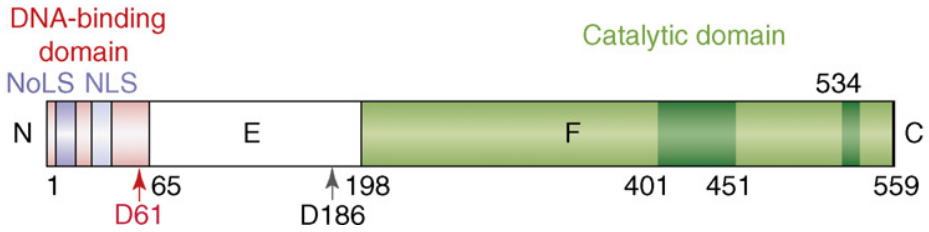


Figure 17 : Schéma représentatif des différents domaines de PARP-2 (d'après Yelamos et al. (2008) (548)).

PARP-2 est constituée de 570 acides aminés. Dans la famille PARP, elle est l'homologue le plus proche de PARP-1, avec une homologie approximative de 69% (voir Tableau 4). PARP-2 contient trois domaines principaux : un domaine DBD, un domaine E et un domaine catalytique F. Contrairement à PARP-1, PARP-2 ne contient pas de domaine d'auto-modification. PARP-2 contient également des sites de clivage de la caspase 3 (résidus aspartique D61) et de la caspase 8 (D186) (547).

Le domaine DBD de PARP-2 est situé dans la région N-terminale entre les acides aminés 1 et 75 et est très différent de celui de PARP-1 (12). Cependant il contient comme PARP-1 une région NLS et une région NoLS (*Nucleolar Localisation Signal*). Contrairement au domaine DBD de PARP-1, celui de PARP-2 ne contient pas de motifs de type à doigt de zinc et est structurellement différent. Cette différence pourrait expliquer pourquoi PARP-2 se lie spécifiquement aux *gaps* et PARP-1 aux *nicks* (12,13,218,516).

Le domaine F contient le site catalytique qui est fortement homologue à celui de PARP-1, et est constitué de deux sous domaines : un domaine hélicoïdalα en N -terminal, entre les acides aminés 207 et 324, et un domaine mixteα/β en C -terminal, entre les acides aminés 332 et 557.

Le domaine E, situé entre les domaines DBD et F, joue le rôle du domaine d'auto-modification et est le siège de l'interaction PARP-1/PARP-2. L'interaction entre les deux enzymes par l'intermédiaire de deux domaines de PARP-1 (BRCT et DBD) (451). Le domaine E de PARP-1 n'ayant pas de fonctions déterminées à ce jour, il ne présente aucune caractéristique fonctionnelle avec le domaine E de PARP-2, et cela malgré une séquence aminoacide bien conservé (38% d'identité et 47% d'homologie de séquence). Ceci suggère que le domaine E de PARP-2 associe les caractéristiques fonctionnelles des domaines D (BRCT) et E de PARP-1 (451).

Fonctions de PARP-2:

PARP-2 est impliquée dans de plusieurs processus cellulaires. La réalisation des modèles animaux et cellulaires déficients en PARP-2 a permis de montré qu'elle a des rôles essentiels dans l'intégrité génomique et la réponse aux dommages de l'ADN (Introduction générale § IV.1.1.2.2) ; le maintien de l'intégrité de l'hétéro-chromatine constitutive (centromères et télomères) et facultative (inactivation du chromosome X) ; la spermatogénèse ; le développement des lymphocytes T et l'adipogénèse.

PARP-2 interagit au niveau du centromère avec PARP-1, les protéines des kinétochores, CENPA et CENPB (*centromere protein A and B*), et la protéine « checkpoint » du fuseau mitotique BUB3 (447,448). PARP-2 semble associée de façon transitoire aux centromères par l'extérieure des kinotochores dans les cellules en pro-métaphase et en métaphase (448). Les cellules de souris *Parp-2*$^{-/-}$ présentent des défauts de ségrégation chromosomique mitotique, dues à une structure de l'hétéro-chromatine centromérique défectueuse et/ou à des configurations anormales du fuseau méiotique (104,343). Toutes ces observations argumentent en faveur d'un rôle essentiel de PARP-2 dans la ségrégation chromosomique à travers le maintien de la structure de l'hétérochromatine centromérique et/ou de l'intégrité du fuseau mitotique.

PARP-2 est impliquée également dans le maintien de l'intégrité de l'hétéro-chromatine télomérique via son interaction fonctionnellement avec TRF2 (*telomeric repeat binding factor 2*) (103). Ce dernier est un partenaire majeur de structuration et de protection des télomères grâce à sa capacité à interagir avec les protéines de signalisation et de réparation des dommages de l'ADN (103,367,522,539). PARP-2 régule la liaison de TRF2 à l'ADN d'une part grâce une hétéro-modification covalente du domaine de dimérisation de TRF2, et d'autre part par une liaison non covalente du PAR sur le DBD de TRF2.

Le rôle de PARP-2 dans l'intégrité de l'hétéro-chromatine facultative de l'inactivation du chromosome X a été mis en évidence par l'observation de la létalité embryonnaire des souris femelle *Parp-1*$^{+/-}$, *Parp-2*$^{-/-}$ associée à une instabilité dramatique du chromosome X (343).

L'étude du phénotype des souris déficientes en PARP-2 a également permis de découvrir l'implication de PARP-2 dans le contrôle de la différenciation des cellules germinales mâles. En effet, l'absence de PARP-2 engendre une hypofertilité masculine associée à des anomalies importantes à différentes étapes du processus de la spermatogénèse (104).

L'importance de PARP-2 dans le développement thymique aussi a été mise en évidence par l'étude des souris *Parp-2*$^{-/-}$. En effet, ces souris sont caractérisées par une diminution dramatique de la survie spontanée des thymocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ (104).

La participation de PARP-2 dans l'adipogénèse a été mise en évidence par l'observation d'une réduction significative du tissu adipeux blanc chez les souris déficientes en PARP-2 par rapport aux souris sauvages. Cette anomalie fonctionnelle est associée à une déficience dans la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (23).

On notera enfin que PARP-2 pourrait jouer un rôle dans le contrôle du *checkpoint* G2/M du cycle cellulaire en réponse aux faibles doses de RI (516,548).

1.1.2.2. Rôles de PARP-2 dans la réparation des dommages de l'ADN

De même que PARP-1, PARP-2 est un facteur essentiel pour le maintien de l'intégrité génomique via son rôle dans la signalisation et la réparation des lésions de l'ADN telles que les CSBs. L'activité enzymatique de PARP-2 est rapidement et fortement stimulée en réponse aux CSBs. PARP-2 est un partenaire essentiel du complexe fonctionnel du BER/SSBR, elle interagit avec PARP-1, XRCC1, l'ADN Polβ et l'ADN ligase III (12,362,451). Il a été montré que PARP-1 et PARP-2 forment des homo- et des hétéro-dimère, cependant les deux protéines n'ont pas les mêmes cinétiques de recrutement au site du dommage : tandis que PARP-1 s'accumule de façon très rapide et transitoire, PARP-2 est recruté de façon moins rapide et persiste plus longtemps par rapport à PARP-1 (362). On a aussi montré que le recrutement de XRCC1 au site du dommage, dans des cellules de souris, dépend majoritairement de PARP-1 et de son activité (136,273,362,386). L'ensemble de ces observations favorisent l'implication de PARP-2 aux étapes tardives du processus de réparation par le BER/SSBR. Ceci est renforcé, comme mentionné ci-dessus, par le fait que PARP-2 puisse lier plus spécifiquement des structures intermédiaires, de types *gaps*, *flaps* (516). Ainsi, PARP-1 et PARP-2 ont des

rôles clés mais distincts dans l'organisation spatio-temporelle des processus du BER/SSBR. Cette participation distincte de PARP-2 par rapport à PARP-1 pourrait expliquer pourquoi les souris ou les cellules déficientes de PARP-2 sont moins sensibles aux RI et aux agents alkylants que celles déficientes de PARP-1 (343). D'autre part on notera que les cellules MEF Parp-2-/- ou Parp-1-/- représentent toutes les deux un retard dans la réparation des bases alkylées (451,503), alors que la déplétion de *Parp-2* dans les cellules humaine A549 n'a qu'un effet mineur sur le SSBR global (156).

A ce jour, le rôle de PARP-2 dans la signalisation et/ou la réparation des CDBs par les voies RH et NHEJ n'est pas connu. La mortalité embryonnaire des souris Parp-2$^{-/-}$ Atm$^{-/-}$ (218) est probablement la conséquence d'une conversion des CSBs spontanées en CDBs létales dans ces cellules hautement prolifèratives. Toutefois nous n'excluons pas la possibilité d'une participation directe de PARP-2 dans les mécanismes de réparation des CDBs.

1.1.3. La poly(ADP-ribose)polymérase 3 (PARP-3)

1.1.3.1. Structure et fonction de PARP-3

L'analyse de la séquence 5' du gène *PARP-3* humain a révélé l'existence d'un épissage alternatif responsable de l'expression de deux isoformes de tailles différentes et qui diffèrent par 7 acides aminés dans la partie N-terminale (21). Ces deux isoformes seraient nucléaires (439). PARP-3 présente une forte homologie (approximativement 61%) avec PARP-1. La PARP-3 humaine est une protéine nucléaire de 60 kDa qui contient un domaine N-terminal WGR (riche en résidus tryptophane, glycine et arginine) et un domaine catalytique C-terminal. La fonction du domaine WGR reste à ce jour inconnue. Il pourrait avoir un rôle dans la liaison de la protéine avec l'ADN (490). La structure cristallisée du domaine catalytique montre qu'il est très similaire à ceux de PARP-1 et PARP-2 (308). Bien que le domaine catalytique de PARP-3 est très conservé et contient les résidus Glu catalytiques, il n'est pas certain que PARP-3 puisse former des poly(ADP-ribose), Loseva et al. ont (308) montré que PARP-3 est plutôt une mono-ADP-ribosylase.

Augustin et al. ont rapporté que la PARP-3 humaine (hPARP-3) s'associe préférentiellement avec les centrioles filles dans les centrosomes (21). Toutefois la surexpression de la protéine hPARP-3 ou seulement de son domaine N-terminal n'a pas d'impact sur la duplication du centrosome ou son amplification, mais interfère sur la progression du cycle cellulaire dans la transition des phases G1-S. Ainsi, hPARP-3 pourrait exercer une fonction dans la maturation des centrioles filles au point de restriction G1-S.

Selon Rouleau et al. (439), PARP-3 serait associée aux complexes polycomb, ce qui suggère un rôle éventuel de PARP-3 dans répression de la transcription.

1.1.3.2. Rôles de PARP-3 dans la réparation des dommages de l'ADN

PARP-3 interagit avec les histones H3C et H2BE (144) et s'associe à plusieurs protéines de réparation des dommages de l'ADN. Elle interagit avec PARP-1 et co-immunoprécipite avec DNA-PKcs, ADN ligase III et IV, Ku70 et Ku80 (439). Ceci suggérait que PARP-3 est aussi impliquée dans le maintien de l'intégrité génomique. En effet, les études menées récemment sur PARP-3, dans le but de définir ses fonctions *in vivo*, la décrivent comme un nouvel acteur de la réparation, plus spécifiquement dans la réparation des cassures double-brins par la voie NHEJ (41,441). PARP3 est également un facteur critique dans la progression mitotique, et est impliqué dans le maintien de la stabilité du fuseau mitotique et de l'intégrité des télomères en interagissant et régulant les partenaires mitotiques NuMA et tankyrase 1 (41).

1.2. Les inhibiteurs d'activité PARP

1.2.1. Structures et principe d'action des inhibiteurs de PARP

La plupart des inhibiteurs de PARP sont des analogues du NAD. Ils agissent par compétition avec le NAD au niveau du site catalytique des PARPs, inhibant ainsi leurs activités enzymatiques (186). Les premiers inhibiteurs utilisés ont été des dérivés du benzamide, tels le 3-aminobenzamide (3-AB).

La stéréochimie de l'interaction des inhibiteurs de PARP avec les sites catalytiques des PARPs impose quatre conditions aux inhibiteurs de PARP :

(i) elles doivent contenir un cycle aromatique,

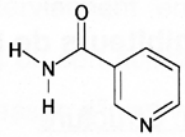
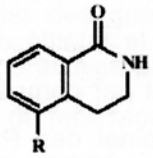
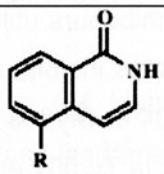
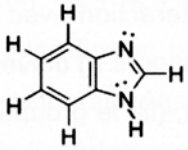
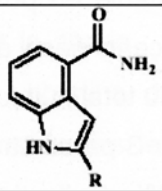
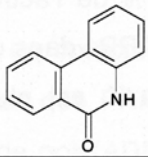
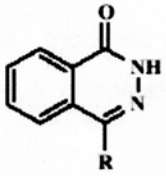
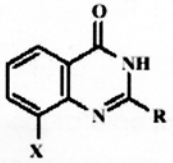
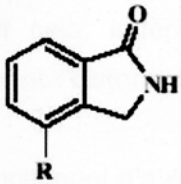
(ii) ce cycle doit porter un groupe carboxamide,

(iii) le groupe carboxamide doit être en position cis,

(iv) ce groupe doit avoir une liaison stable en position 3.

En plus du nicotinamide et du 3-aminobenzamide, plusieurs centaines de composés de synthèse présentent ces caractéristiques. On distingue au total huit groupes de composés (Tableau 5) (25,479). Ces composés sont caractérisés par trois paramètres, à savoir K_i (affinité pour les PARPs isolées), IC (concentration inhibant 50% de l'activité des PARPs isolées) et EC (concentration inhibant 50 % de l'activité des PARPs dans un contexte cellulaire) (479).

Tableau 5: Structures des huit principaux groupes d'inhibiteurs compétitifs du NAD+ et valeurs de leur IC50 pour PARP-1 in vitro (d'après Southan G.J. et al. (2003) (479))

Série	Formule	IC_{50}
Nicotinamide		$IC_{50} \approx 30\ \mu M$
Dihydroisoquinolinone		$0,10 \leq IC_{50}\ 0,50\ \mu M$
Isoquinolinone		$0,10 \leq IC_{50} \leq 1,5\ \mu M$
Benzimidazole		$0,006 \leq IC_{50} \leq 3\ \mu M$
Indole		$0,02 \leq IC_{50} \leq 0,04\ \mu M$
Phénanthridininones		$0,21 \leq IC_{50} \leq 3,4\ \mu M$
Phthalazinone		$28 \leq IC_{50} \leq 100\ \mu M$
Quinazolinone		$0,40 \leq IC_{50} \leq 8\ \mu M$
Isoindolinone		$IC_{50} > 10\ \mu M$

1.2.2. Applications thérapeutique des inhibiteurs de PARP

Un grand nombre d'entreprises pharmaceutiques ont entrepris la synthèse des molécules inhibitrices de PARP. Le champ des applications des inhibiteurs de PARP est extrêmement large. Ils ont été testées dans plusieurs pathologies, dont: l'ischémie-perfusion post-accident vasculaire cérébral (125), les infarctus du myocarde (292), les troubles de la vascularisation digestive (291), rénale (80), musculaire (47), hépatique (47), auditive (485) et rétinienne (83). De nombreux modèles ont servi pour tester l'efficacité des inhibiteurs de PARP dans ces pathologies (191,460,479). Les inhibiteurs de PARP ont également été testés dans le diabète de type I et dans l'ostéo-arthrose (59,231). Dans toutes ces pathologies, les inhibiteurs de PARP ont été utilisés pour bloquer l'hyper-activation de PARP en réponse à des stress génotoxiques, et freiner la mort nécrotique par déplétion du pool de NAD^+ (Figure 17). Toutefois, le rôle de « gardien du génome » de PARP-1 et PARP-2, lié à leur fonction dans le BER et le SSBR, interroge pour une utilisation chronique des inhibiteurs de PARP dans des pathologies inflammatoires qui ne compromettent pas la survie du patient.

Les inhibiteurs de PARP sont actuellement en essaie clinique comme une nouvelle classe thérapeutique en cancérologie dont les résultats d'efficacité actuels sont prometteurs. En effet, certains de ces inhibiteurs montrent, suivant le principe de létalité synthétique, une cytotoxicité significative sur les cellules cancéreuses déficientes en BRCA1 et BRCA2 (Figure 18), deux protéines impliquées dans la réparation des CDBs par HR et qui jouent un rôle important dans le maintien de la stabilité du génome humain. Les inhibiteurs de PARP agissent sur le système de réparation de l'ADN en synergie avec la perte de la fonction de BRCA par les cellules tumorales, provoquant une importante instabilité génétique qui amène à la mort de la cellule.

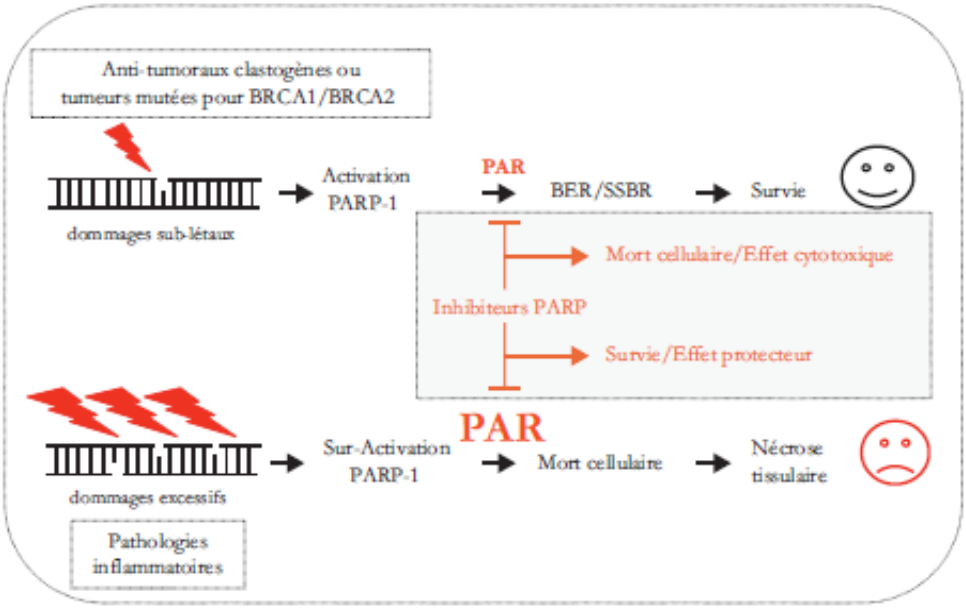


Figure 18 : Principe de lutte, par utilisation des inhibiteurs de PARP, contre les tumeurs cancéreuses mutées pour *BRCA1/BRCA2* et les pathologies inflammatoires (d'après Dantzer et al. (2011) (105)).

D'autre part l'inhibition chimique des PARPs présente un intérêt thérapeutique majeur puisqu'elle potentialise l'action d'agents chimio- et radio-thérapeutiques en stimulant la mort cellulaire des cellules tumorales. Plusieurs études pré-cliniques récentes réalisées sur des cultures de cellules tumorales humaines ou des xénogreffes de tumeurs humaines ont permis de mettre en évidence une action synergique efficace de l'inhibition des PARPs avec des agents méthylants (temozolomide : TMZ), des sels de platine (cisplatine), du cyclophosphamide, des poisons de la topoisomérase I (topotecan et campthotecine : CPT) et les RI (129,424,552).

C'est avec le TMZ que le premier essai clinique en cancérologie utilisant les PARPi a été publié en 2005 (407). Le TMZ est un agent alkylant qui traverse la barrière hémato-méningée. Il est utilisé dans le traitement des gliomes et des mélanomes métastatiques (347,390,549). Le TMZ induit la méyhylation des guanines en positions N^7 ou O^6 et des adénines en position N^3 (voir Introduction générale chapitre II). Ces lésions sont réparées par les O^6-methylguanine DNA-methyltransférases (MGMT) et les voies du BER et du MMR. In vitro et en exposition concomitante, les inhibiteurs de PARP potentialisent l'effet cytotoxique du TMZ (45,495,496). On notera que 70% des lésions provoquées par le TMZ sont réparées par le BER. Cependant, même en présence de défauts du système MMR qui confère une

résistance au TMZ par tolérance à la présence de l'O^6-méthylguanine, l'association à un inhibiteur de PARP se révèle efficace.

Bien que les inhibiteurs de PARP potentialisent l'effet des poisons de topoisomérase I, tels que le topotecan et la camptothecin (CPT), ils ne modifient pas la réponse aux poisons de topoisomérase II (48,375). Il est vraisemblable que cet effet procède de la formation de cassures double-brin létales par passage de CSB non réparées à travers les fourches de réplication (318,349).

Depuis le premier essai clinique (phase I) favorable effectué avec l'inhibiteur AG014699-Pfizer pour potentialiser la cytotoxicité du TMZ sur des tumeurs solides (408), d'autres compagnies pharmaceutiques se sont engagées dans des essais cliniques (phase I et II) ciblant des tumeurs solides telles que des glioblastomes, des cancers métastasiques du sein et/ou de l'ovaire chez des patientes porteuses de mutations *BRCA1* ou *BRCA2*. Le tableau suivant résume les essais cliniques, utilisant des inhibiteurs de PARP, et qui sont en cours.

Tableau 6 : Synthèse des essais cliniques en cours utilisant les inhibiteurs de PARP dans le domaine de la cancérologie (adapté d'après : Ratnam K et al. (2007) (424), Dantzer et al. (2011) (105) et *http://www.clinicaltrials.gov*). Ph : phase, I.V : intraveineuse.

Agent	Société	Seul/combinaison thérapeutique	Voie d'administration	Maladie	Essais cliniques
AG014699	Pfizer (New York, NY)	Avec TMZ	I.V	Tumeurs solides, mélanomes malins métastatiques	Ph I sur tumeurs solides terminé. Ph II sur mélanome terminée. Ph II sur les cancers métastatiques sein/ovaires BRCA ½ en cours
AF-01367338 et AG-014699	Pfizer (New York, NY)	Seul	-	Cancer ovaire et cancer du sein BRCA ½	Ph I en cours
Ku-0559436 et Olaparib	KuDos (London,UK)	Seul	Oral	Tumeurs solides avancées, cancer du sein, de prostate et de pancréas	Ph I sur tumeurs solides complète. Ph II sur cancer du sein BRCA ½ en cours
AZD 2281	AstraZeneca (London,UK)	Seul	Oral	Cancer Ovaire BRCA ½	Ph II en cours
AZD 2281 Ku-0559436 Olaparid	AstraZeneca/ KuDos (London,UK)	Avec Carboplatine	-	Cancer triple négatif	Ph I en cours
ABT-888 et Veliparid	Abott Lab. (Chicago, IL)	Seul	Oral	Tumeurs solides réfractaires, leucémie et lymphomes.	Ph I terminée.
ABT-888 (Veliparib)	Abott Lab. (Chicago, IL)	Avec Paclitaxel, Carboplatine et bévacizumab	-	Cancer ovaire, Trompe de Fallope, Cancer péritonéal	Ph I en cours.
BSI-201	BiPar (Brisbane, CA)	Seul	IV	Cancer ovaire	Ph I.
SAR240550	Sanofi-Aventis	Seul	IV	Trompe de Fallope et cancer péritonéal	Ph I.
BSI-201 SAR240550	Sanofi-Aventis	Avec TMZ	-	Glioblastome	Ph II en cours
MK-4827	Merck	-	-	Tumeurs solide, cancer de prostate et ovaire	Ph I en cours
INO-1001	Inotek/ Genentech (Beverly, MA)	Avec TMZ, seul	IV	Mélanomes, glioblastomes multiformes	Ph I en cours.
GPI 21016	MGI Pharma (Bloomington, MN)	Avec TMZ	Oral	Tumeurs solides.	Ph I planifiée.
CEP-9722	Céphalon	Avec TMZ ou placébo	-	Tumeurs solides avancés	-

Dans ce travail de thèse nous avons utilisé comme inhibiteur de PARP le 4-amino-1,8-naphthalimide (ANI) et le (R)-2-(2-méthylpyrrolidine-2-yl)-1H-benzo[d]imidazole-4-carboxamide (ABT-888 dit aussi Veliparib).

Le 4-amino-1,8-naphthalimide (ANI) :

L'ANI est un dérivé tricyclique des isoquinolinones dont l'EC et l'IC50 sont de l'ordre de 180 nM (25,479). L'ANI est donc environ 1000 fois plus puissante que le 3-AB. En culture cellulaire, une concentration d'ANI de 30 µM est bien tolérée (450) et se montre suffisante pour abolir la synthèse de PAR dans des cellules exposées à de l'H_2O_2 ou des RI. A cette concentration l'activité de la télomérase n'est pas affectée (177). L'ANI est efficace pour réduire les séquelles de l'ischémi-reperfusion dans le cœur, les reins et les muscles (46,47,291,292). Il peut également produire des effets radio et chimio-sensibilisateurs *ex vivo* (34,450). L'ANI est soluble dans le DMSO mais pas dans l'eau.

L'ABT888 (Veliparib) :

L'ABT888 est un inhibiteur puissant des PARP caractérisé par son faible poids moléculaire et une haute solubilité et perméabilité lui donnant une excellente biodisponibilité. Il est très spécifique pour PARP-1 et PARP-2 avec, respectivement, des K_i de 5.2 et 2,9 nM *in vitro*, et n'inhibe pas les autres enzymes NAD-dépendantes (129). L'ABT888 seul n'est pas cytotoxique dans les cellules HR positives, cependant il a une activité anti-tumorale très prometteuse dans les cellules HR déficientes ou en combinaison avec des agents clastogènes. Donawho et al. ont montré pour la première fois que l'ABT-888 potentialise l'effet (i) du TMZ dans le mélanome murin B16F10s.c et le gliome orthotopique 9L des rats ; (ii) du cisplatine, du carboplatine et du cyclophosphamide dans le modèle MX-1 xénogreffes de cancer du sein ; (iii) et des RI (2 Gy/Dose x 10) dans le modèle HCT-116 de cancer du colon (129). L'ABT-888 seul n'a aucun effet sur ces modèles tumoraux. Une étude très récente a montré que la combinaison de l'ABT-888 aux RI est hyper-toxique pour des cellules cancéreuses de la tête et du cou (379). Cette sensibilité accrue est associé à la persistance des dommages d'ADN après RI par bloquage de la réparation des CDBs au niveau des fourches de réplication. Plusieurs essais cliniques sur l'effet de l'ABT888, seul ou combiné, sur différent tumeurs sont en cours (Tableau 6) (*http://www.clinicaltrials.gov).*

1.3. Le catabolisme des poly(ADP-ribose)

Le métabolisme de la poly(ADP-ribose)ylation est composé non seulement de la synthèse des PAR mais aussi de leur dégradation. En effet, la synthèse des PAR est transitoire et réversible sous l'intervention de deux enzymes: la PARG responsable de la dégradation des PAR et l'ADN ribose protéine lyase (Figure 19). Cette dernière est capable d'hydrolyser spécifiquement la liaison ester proximale des monomères d'ADP-ribose, au niveau du groupement COOH terminal des protéines cibles (107). Cette activité reste spéculative dans la mesure où aucune ADP-ribose lyase n'a été clonée à ce jour.

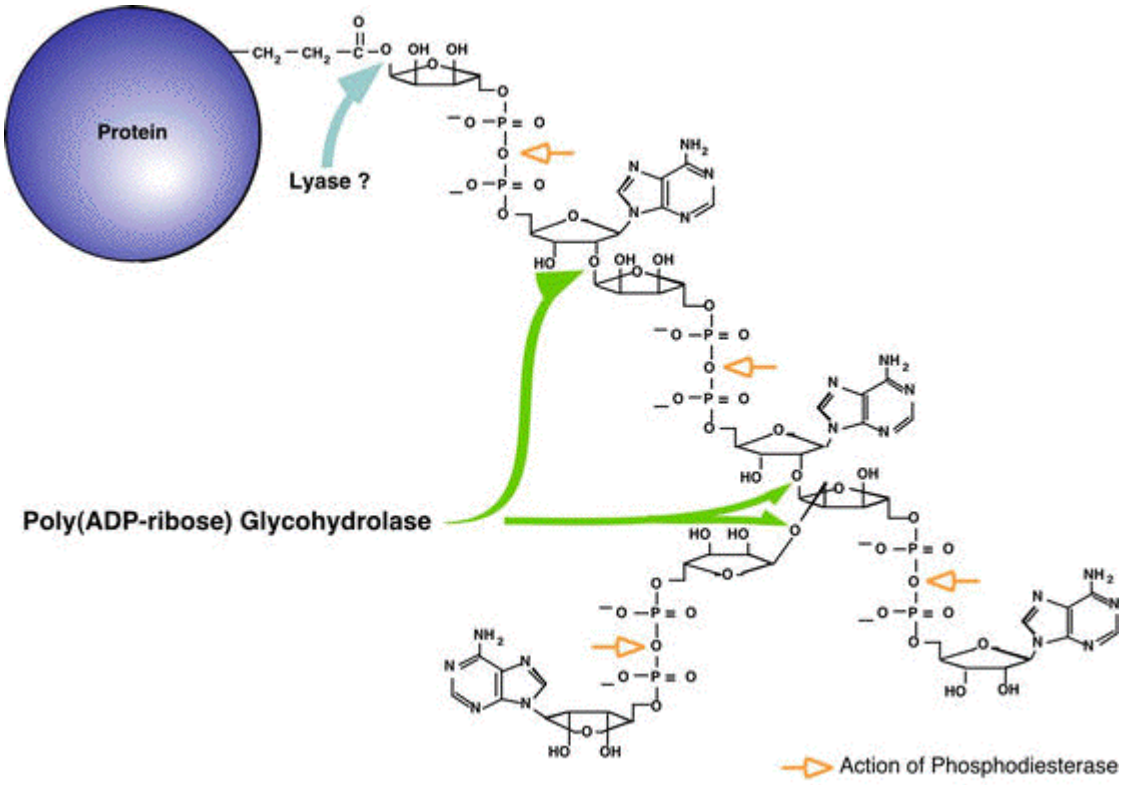


Figure 19 : Clivage des PAR par PARG et des mono-ADP-ribose par l'ADP-ribose lyase (source:http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/COURS/ADPribosyl/1ADPribosylation.htm)

1.3.1. La poly(ADP-ribose) Glycohydrolase (PARG)

PARG dégrade les polymères grâce à ses activités endo- et exo-glycosidases. Ces activités enzymatiques permettent l'hydrolyse des liaisons glycosydiques entre les résidus d'ADP-ribose aussi bien linéaires que ramifiés. La longueur et le degré de ramification des PAR déterminent le temps nécessaire (de l'ordre d'une minute) à leur dégradation par la PARG. Chez les mammifères, le même gène code plusieurs isoformes de PARG grâce à des épissages alternatifs. Les protéines PARG qui en résultent se situent dans différents

compartiments cellulaires. Les principales PARG, les plus actives, sont la PARG nucléaire (110 KDa) et l'isoforme mitochondriale (65 KDa). D'autres variants d'épissage alternatif ont également été identifiés. Ils sont dépourvus soit de l'exon 1 (102 KDa), soit des exons 1 et 2 (99 KDa) et localisés dans le cytoplasme (344,345,371,531). Le rôle et la localisation de ces isoformes secondaires dans le cytoplasme ne sont pas encore bien compris.

Il existe une autre glycohydrolase mitochondriale de 39 KDa, ARH3 (ADP-ribosilarginine hydrolase 3), capable d'hydrolyser les PAR (385). ARH3 est très différente de PARG et ne présente aucune homologie avec elle, ce qui témoigne de la complexité et de l'importance du métabolisme des PAR. L'activité enzymatique d'ARH3 est très faible par rapport à celle de PARG.

1.3.2. Rôle de PARG dans le maintien de l'intégrité du génome

L'importance des protéines PARG a été démontrée par la construction de souris transgéniques et l'identification d'inhibiteurs (259,311). Les souris homozygotes mutées (par une délétion) dans l'exon 4, et n'exprimant aucune isoforme de PARG, présentent une létalité embryonnaire au jour 3,5 liée à une apoptose induite par l'accumulation de PAR (258). Des résultats similaires ont été obtenue chez D. melanogaster où l'accumulation de PAR conduit à une neuro-dégénérescence dans les stades larvaires (199). On sait également que dans les cellules humaines, PARG joue un rôle important dans la réponse aux lésions simple-brin de l'ADN. En effet, les cellules dans lesquelles l'expression de PARG est réprimée par ARNi , montrent un retard dans les cinétiques de réparation de CSB du même ordre que celui obtenu dans les cellules n'expriment pas PARP-1. Ces résultats suggèrent que PARP-1 et PARG agissent en étroite collaboration pour accélérer le SSBR (156). Le fait que les inhibiteurs de PARG chimio-sensibilisent les mélanomes malins traités par le TMZ (156) et que les cellules humaine A549 dépourvues de PARP-1 ou PARG présentent toutes les deux un retard dans la réparation des cassures de l'ADN après traitement avec le H_2O_2 (140) est également en faveur de cette hypothèse. En 2009, Amé et al. (11) avaient montré que les cellules HeLa déficientes en PARG présente une radiosensibilité plus élevée que les HeLa contrôles. Cette augmentation de la radiosensibilité est due à des défauts de réparation des CSBs et des CDBs, et de la progression mitotique. Une étude plus récente de Mortusewicz et al. (363) montre que PARG est recrutée au site du dommage selon deux mécanisme, le premier PARP-1/PAR dépendant et le deuxième PCNA dépendant (via une interaction protéine-protéine). Ce double mode de recrutement au site du dommage plus les données sur l'interaction de PARG avec

PARP-1 et XRCC1 (245) suggèrent un rôle supplémentaire de PARG dans la régulation du SPR et LPR et la balance entre ces deux voies.

1.4. La poly(ADP-ribose)ylation et la chromatine

Le génome des mammifères est composé d'environ 2 m d'ADN fermement compacté dans une structure nucléoprotéique appelée chromatine. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome constitué d'environ 146 paires de bases enroulées autour d'un octamère d'histones. Les octamères d'histones sont formés de l'association des quatre histones de structure : H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 est présente dans la région internucléosomique de l'ADN et a une grande influence sur les interactions entre les nucléosomes et sur les niveaux de compaction de la chromatine (pour revue voir (96)). L'existence de variants dans la composition des histones contribue à la spécialisation des nucléosomes. La structure de la chromatine peut également varier en fonction des modifications post traductionnelles des extrémités C- ou N-terminales des histones qui prolongent le nucléosome. Ces modifications peuvent mettre en jeu des réactions de phosphorylation, d'ubiquitination, de SUMOylation, de méthylation, d'acétylation et de poly(ADP-ribosyl)ation. Toutes ces modifications sont dynamiques et jouent un rôle important lors de la réparation des lésions de l'ADN (pour revue, voir (411). Si les réactions de phosphorylation, de méthylation et d'acétylation de la chromatine sont bien documentées, l'importance croissante des modifications par poly(ADP-ribosyl)ation émerge depuis quelques années.

Au niveau transcriptionnel, PARP-1 intervient à la fois dans le remodelage de la structure chromatinienne via son activité enzymatique ou structurellement par sa capacité de liaison aux nucléosomes qui peuvent altérer la transcription (251,523).

Tulin et col ont montré chez la Drosophile, que PARP-1 est essentielle pour la formation et l'organisation de l'hétérochromatine (507) et que son activation au cours du développement induit localement un relâchement de la chromatine indispensable à la transcription de certains gènes (506). Sur les cellules de mammifères, il a été montré que l'activité enzymatique de PARP-1 facilite: (i) la libération de l'histone H1 de certains promoteurs de transcription (265) ; (ii) le recrutement de la protéine chromatinienne HMGB1 sur ces promoteurs (265) ; (iii) et la poly(ADP-ribose)ylation et le déplacement de l'histone H2A1.1 et des histones H3 et H2B (391).

Dans le contexte de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, la modification des histones par poly(ADP-ribose)ylation joue un rôle important dans la reconnaissance des sites des dommages et l'accessibilité de la machinerie de réparation d'ADN.

La poly(ADP-ribose)ylation de la chromatine, par PARP-1 et/ou PARP-2 en réponse au dommage de l'ADN, induit la relaxation de la fibre chromatinienne de 30 nm ce qui facilite le recrutement et augmente l'accessibilité des différents facteurs de la réparation (Figure 20) (108,409,426).

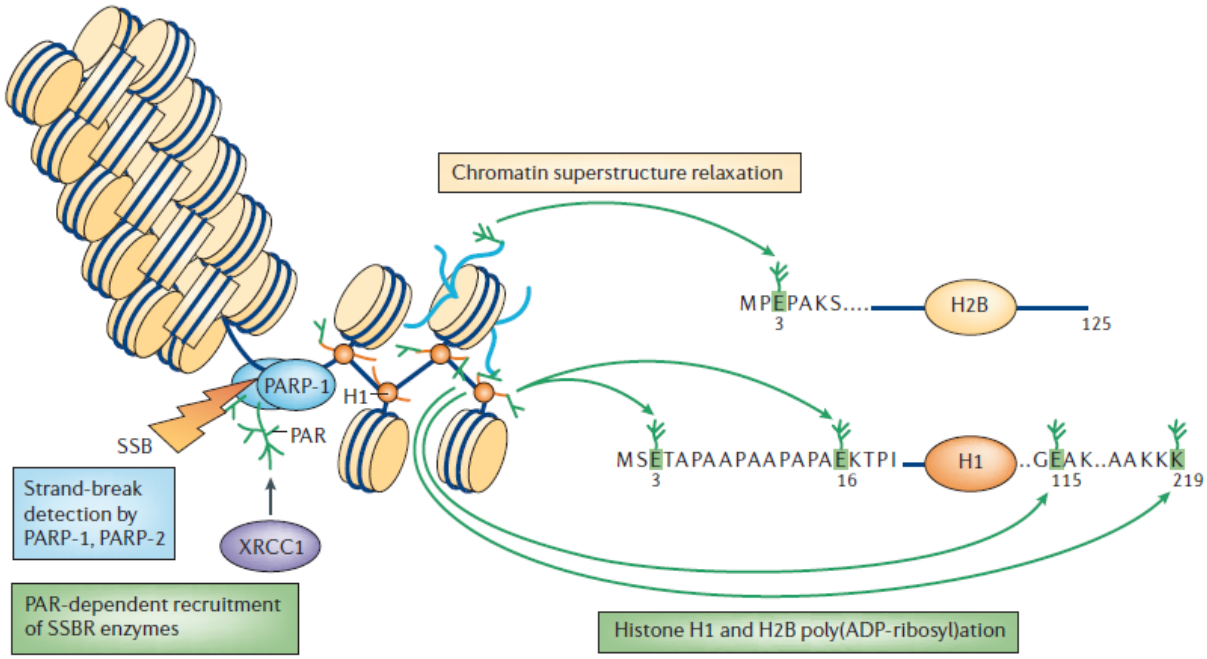


Figure 20 : Relaxation de la chromatine par poly(ADP-ribose)ylation des histones H1 et H2B en réponse à une CSB (d'après Schreiber et al. 2006).

Les premières études ont montré que PARP-1 poly-ADP-ribosyle les histones (principalement l'histone H1) ce qui conduit à une décondensation de la chromatine, permettant le recrutement et l'accès de la lésion aux protéines de la réparation (219,409,438). L'interaction de PARP-1 avec la chromatine est un processus dynamique avec un échange continu de PARP-1 entre la chromatine et le nucléoplasme d'une part, et entre les différents domaines chromatiniens d'autre part. In vitro, PARP-1 se lie aux histones H1, H2A et H2B qui sont modifiées enzymatiquement par PARP-1. Les histones H3 et H4 sont essentielles pour l'interaction de PARP-1 avec les nucléosomes (405). Chez la Drosophile, la fixation de la région C-terminale de PARP-1 avec l'extrémité N-terminale de l'histone H4 déclenche son activité enzymatique, indépendamment de sa fixation à l'ADN. Cette poly(ADP-ribosyl)ation dépendante de l'histone H4 est bloquée par fixation de l'histone H2A (405). La poly(ADP-ribose)ylation de la chromatine touche non seulement les histones, mais aussi des protéines non histoniques telles que HMGP (*High Mobility Group Proteins*) et les protéines

hétérochromatiniennes HP1α et HP1β (418,489). HP1α est une cible commune de PARP-1 et PARP-2 (418).

En plus de son rôle dans la réparation d'ADN, PARP-1 joue aussi un rôle dans la réparation de la chromatine après un stress oxydatif. Les histones nucléosomiques protègent l'ADN des dommages induits par les radicaux libres de l'oxygène. Cette protection dépend principalement de leur assemblage (139). Les histones oxydées sont capables de lier l'ADN et vont donc affecter le bon déroulement du processus dissociation-réassemblage des nucléosomes. Donc, pour maintenir l'intégrité génomique et épigénétique, les histones oxydées doivent être remplacées et dégradées. La dégradation est assurée par le protéasome 20S et elle est fortement sélective, grâce à la poly(ADP ribose)ylation. En effet, alors que les histones H1 et H4 sont dégradées rapidement, la dégradation des histones H2A-poly(ADP-ribose)ylées est très lente (512), ce qui laisse supposer que la poly(ADP ribose)ylation protège les histones de leur dégradation. De ce fait, les histones oxydées sont donc moins poly(ADP-ribose)ylées ce qui les expose davantage à leur dégradation par le protéasome (76). De plus, le protéasome 20S se lie à la PARP-1 automodifié, ce qui stimule son activité protéolytique (331).

De même que PARP-1, PARG influence également la structure chromatinienne. Les deux protéines interagissent avec le répresseur SIR2 (*silent information repressor protein-2*) ce qui conduit à une régulation de domaines spécifiques chez la Drosophile. En effet, l'activation de PARP-1 et la poly(ADP-ribosyl)ation qui en découle conduit à un relachement de la chromatine, permettant ainsi un accès du represseur SIR2 aux extrémités acétylées des histones. PARG intervient dans ce processus en dégradant les polymères, contrôlant de la sorte l'activité de SIR2 et sa localisation (505).

Les effets combinés de la poly(ADP-ribosyl)ation et d'autres modifications post traductionnelles ont aussi été décrits. Par exemple, la poly(ADP-ribosyl)ation peut se produire sur des histones acétylées et les histones néo-synthétisées sont à tour de rôle poly(ADP-ribosylées et acétylées, facilitant ainsi leur assemblage dans les nucléosomes et leur accessibilité au cours de la réplication (148).

La phosphorylation du variant H2AX en réponse aux dommages de l'ADN a été décrite depuis de nombreuses années. Elle intervient comme un signal de recrutement et/ou de rétention des protéines de réparation et du *checkpoint* au niveau du dommage. Les facteurs associés, DNA-PK, PARP-1 et le complexe FACT (facilitates chromatin transcription) favorisent à la fois l'intégration et la dissociation de H2AX et son échange avec l'histone H2A

conventionnelle. L'histone chaperonne FACT (Spt16/SSRP1) est relarguée de la chromatine endommagée après poly(ADP-ribosyl)ation de sa sous-unité Spt16 (209).

Une autre dimension de la fonctions de la poly(ADP-ribose)ylation dans le remodelage de la chromatine est son rôle dans la régulation des méthyltransférases, et donc de l'expression et de la répression des gènes (63). PARP-1 poly(ADP-ribose)ylée interagit via ses PAR avec l'ADN méthyle-transférase 1 (Dnmt1) et inhibe son activité enzymatique. En absence de PARP-1-ADP-ribosylée, Dnmt1 méthyle l'ADN. Si un taux élevé de PARP-1-ADP-ribosylé subsiste (par exemple en absence de PARG), Dnmt1 est inhibé conduisant à une hypo-méthylation de l'ADN. Non seulement PARP-1-ADP-ribosylé se fixe sur Dnmt1 mais il se lie également à son promoteur, maintenant cette région non méthylée (63,551). La balance entre les activités PARP et PARG est donc très critique pour la méthylation des histones.

Dans un nucléosome, la liaison entre les histones et l'ADN implique une centaine d'interactions faibles de type liaisons hydrogènes, électrostatiques et hydrophobes. Il existe au sein de la cellule des complexes multi-protéiques capables de détruire une partie de ces interactions et de faire glisser le nucléosome le long de la fibre d'ADN. Ils sont appelés complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants. Chez l'homme, on compte 4 familles : SWI/SNF, ISWI, CHD et INO80 comprenant un ou plusieurs complexes (169). Ces complexes ont chacun leur spécificité mais on peut cependant en dégager un mécanisme commun. Les protéines constituants ces complexe sont recrutées dans la région de la chromatine modifiée ou à modifier grâce à leurs bromo-domaines, qui interagissent avec les histones acétylés, ou les chromo-domaines, les tudor-domaines ou les domaines MBT (Malignant Brain Tumor) qui interagissent avec les histones méthylées (50,100,212,249). Grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP, ces complexes ATP-dépendants parviennent à détacher une portion plus ou moins importante des histones de l'ADN, créant ainsi une boucle qui se propage le long du nucléosome. A la fin de la réaction, le nucléosome a transloqué d'une distance plus ou moins importante. Ce remodelage a pour effet de relaxer la chromatine et de rendre accessibles certaines séquences d'ADN. Ces complexes interviennent dans tous les processus cellulaires qui nécessitent une modification de la structure chromatinienne : réplication, transcription et réparation.

Le premier facteur chromatinien auquel nous nous sommes intéressés au laboratoire est la protéine CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor 1*). CAF-1 appartient à la famille des protéines chaperonnes des histones. Les protéines chaperonnes assurent un assemblage coordonné des nucléosomes. Elles se lient et neutralisent les histones hautement chargées,

prévenant leur fixation non spécifique sur l'ADN. L'histone chaperonne CAF-1 est composées de trois sous-unités : p150, p60 et p48. CAF-1 est associée avec les formes néo-synthétisées des histones H3 et H4. Sa fonction principale est de favoriser l'assemblage des nucléosomes autour du brin d'ADN néo-synthétisé au cours de la réplication ou lors de la réparation par la voie du BER (pour revue voir (428)). *In vitro*, PCNA interagit avec CAF-1 par l'intermédiaire de sa sous-unité p150 et ces données ont été vérifiées *in vivo* par une co-localisation de PCNA et de CAF-1 au niveau des foyers réplicatifs et des foyers de réparation après dommages aux UV (pour revue, voir (342)). Il a également été montré que la protéine HP1 (heterochromatin protein 1) interagit avec la sous-unité p150 de CAF-1 et que cette liaison favorise la réparation par recombinaison homologue (24).

Au cours de ma thèse, de nouvelles données ont été publiées sur un lien existant entre PARP-1 et le facteur ALC1. ALC1 (*Amplified in Liver Cancer 1*) est l'une des protéines appartenant à ces complexes chromatiniens qui interviennent dans le processus de la réparation. C'est un membre de la superfamille SNF2 (135,157,182) caractérisé par son interaction avec plusieurs protéines de réparation telles que XRCC1, DNA-PKcs, Ku70 et PARP-1 (183). Bien que les études d'alignement de séquences montrent qu'ALC1 est similaire aux autres ATPases de remodelage de la chromatine tels que Snf2, Iswi et Chd1 (157), contrairement à ces derniers, ALC1 ne contient pas des chromo-, bromo-, tudor-domaines, domaines MBT ou d'autres domaines qui lient la chromatine. Cependant, ALC1 contient un macro-domaine carboxy-terminal qui lie l'ADP-ribose et les PAR (241). Grâce à ce domaine, ALC1 est recruté très rapidement au site du dommage de l'ADN via son interaction avec PARP-1 poly(ADP-ribose)ylée et induit ses activités d'ATP-ase et de remodelage de la chromatine qui catalysent le glissement des nucléosomes (3,183). L'activité ATP-asique d'ALC1 dépend donc de sa poly(ADP-ribose)ylation et de son interaction avec les PAR et PARP-1-poly(ADP-ribose)ylée (3,183). En effet, les études *in vitro* montrent que ALC1 contenant un macro-domaine muté (D723A) incapable de lier les PAR, ne présente aucune activité ATP-asique. Cependant, la seule présence des PAR n'est pas suffisante pour induire l'activité ATP-asique d'ALC1. Il a été montré, *in vivo*, par knock-down de PARP-1 (par RNA interférent) et par inhibition de son activité, que le recrutement d'ALC1 au site du photo-dommage dépend majoritairement de la présence de PARP-1 et de la synthèse des polymères (183). Ce recrutement est transitoire (3,183) et, à l'heure actuelle, ni les mécanismes régulant sa dissociation ni les protéines qui y sont impliquées ne sont connues.

Ma N.F. et al. (314) ont montré que la surexpression d'ALC1 induit une augmentation du nombre de colonies cellulaires formées en agar et une augmentation du nombre de tumeurs

dans les souris *nude*, suggérant ainsi un rôle d'ALC1 en tant qu'oncogène. Ahel et al. (3) ont montré que la déplétion d'ALC1 ou sa surexpression, ont toutes les deux un effet sensibilisateur sur les cellules U2OS soumises à des agents de dommages de l'ADN. En cas de déplétion d'ALC1, les cellules deviennent plus sensibles aux effets de l'H_2O_2 et de la Phléomycine (antibiotique appartenant à la famille de la Bléomycine, qui se lie à l'ADN dans des régions relâchées de la chromatine) et non à ceux de la Camptothécine (poison de Topoisomérase I), indiquant un rôle spécifique d'ALC1 dans la réparation des dommages directs de l'ADN. L'ensemble de ces données montrent l'importance du facteur ALC1 dans le remodelage de la chromatine et présentent ALC1 comme un élément critique dans la stabilité génomique et le cancer.

2. La phosphorylation

Le processus de phosphorylation est connu depuis plus d'un siècle (286) par la mise en évidence d'une phospho-sérine dans la vitelline (300), suivie de la première description de la phosphorylation d'une protéine (58). La phosphorylation est la réaction d'estérification de la chaîne latérale de la sérine, de la thréonine ou de la tyrosine, par addition d'un ou plusieurs groupement(s) phosphate. Il existe deux familles des phosphoprotéines (kinases) : les sérine-thréonine kinase et les tyrosines kinases. La phosphorylation est une modification transitoire et réversible par la déphosphorylation catalysée par les phosphatases.

La phosphorylation induit des modifications structurelles et fonctionnelles très importantes de la protéine cible qui ont pour conséquences, entre autres :

- l'induction ou l'inhibition de l'activité enzymatique,
- le changement de la localisation cellulaire,
- et l'association (ou la dissociation) avec d'autres protéines.

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle des protéines absolument capitale qui intervient par l'intermédiaire des différentes kinases dans un très grand nombre de processus cellulaires et dans leurs voies de signalisation. Nous n'exposerons dans ce travail que le rôle de la phosphorylation dans la réponse aux dommages de l'ADN, plus spécifiquement son rôle dans la régulation de l'activité PARP en réponse à ces lésions.

2.1. Le rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'activité PARP

Plusieurs études suggèrent que l'activité enzymatique des PARPs, en particulier celle de de PARP-1, peut être régulée par phosphorylation par plusieurs kinases qui sont impliquées dans les mécanismes de régulation et de signalisation de différents processus cellulaires.

Les premières expériences *in vitro* sur la régulation de l'activité de PARP-1 avaient indiqué que la phosphorylation de PARP-1 par la protéine kinase C (PKC) empêche sa liaison avec l'ADN et inhibe son activité polymérase (26,486). Par la suite, d'autres données obtenues *in vivo* ont révélé que PARP-1 est phosphorylée suite à la lympho-stimulation (multiplication et différenciation des lymphocytes périphériques) induite par la phytohémagglutinin (27) et que pendant la maturation d'ovocyte chez *Xenopus laevis* l'activité PARP-1 est régulée par phosphorylation (16). Plus récemment, Hussain et ses collaborateurs (30) ont montré que le traitement des cellules endothéliales par l'IGF-I provoque la phosphorylation de PARP-1 et l'inhibition de son activité polymérase. Etant donné que les kinases Erk-1 et Erk-2 (*Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*) sont les effecteurs majeurs dans la réponse au signal extracellulaire d'IGF-I (285), il a été suggéré que la phosphorylation de PARP-1 par Erk est responsable de la diminution de son activité. Cependant, les données rapportées par Kauppinen et al. (242) contredisent cette hypothèse. En effet, les auteurs ont observé que la phosphorylation de PARP-1 par Erk-1/2 est nécessaire pour son activation maximale après traitement avec l'agent alkylant MNNG. L'activité PARP-1 peut être aussi déclenchée indépendamment de l'ADN par interaction directe de PARP-1 avec la forme phosphorylée d'Erk-2 sans qu'elle soit elle-même phosphorylée (93). Il y a toujours un peu de confusion dans la littérature en ce qui concerne le rôle d'ERK dans l'activation des PARPs. Par exemple, l'étude d'Ethier et al. (141) montrait que l'inhibition indirecte d'Erk-1, par inhibition de son régulateur MEK, dans les cellules HeLa n'affecte pas la synthèse des PAR après exposition au MNNG.

Une autre protéine kinase (MAPK : *Mitogen-Activated Protéine Kinase*) à été identifiée comme étant impliquée dans l'activation de PARP-1 en réponse à la mort cellulaire induite par H_2O_2, par l'intermédiaire de JNK1 (*c-Jun-N-terminal kinase I*) (554). De plus, les expériences de phosphorylation, *in vitro*, ont montré que PARP-1 est une cible directe de JNK1 (554).

D'autres kinases, comme la calmoduline (CaMK), sont aussi potentiellement impliquées dans la régulation de l'activité de PARP-1 (436). L'activation de PARP-1 par sa phosphorylation par CaMK-II, a été rapportée par Ju et al. (233) dans des voies de régulation transcriptionnelle. Il a été montré aussi que CaMK-II est capable de moduler l'activité de PARP-1 par l'intermédiaire de la kinésine KIF4, permettant la protection des neurones dans le cadre du développement du cerveau (348).

D'autres observations ont conduit à suggérer que le rôle de PARP-1 dans la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN pourrait être régulé par sa phosphorylation en

modulant ses interactions avec les autres protéines de réparation. En effet, les changements dynamiques d'interactions protéine-protéine qui régulent l'assemblage des complexes multi-protéiques sont régulés par la phosphorylation spécifique de certains membres de ces complexes. Par exemple, la phosphorylation de PARP-1 est nécessaire pour son association avec Txk, un membre de la famille des tyrosines kinases Tec (327).

La caséine kinase 2 (CK2) est impliquée dans le phosphorylation et la régulation de l'activité de plusieurs protéines de réparation des dommages de l'ADN comme p53 (38,247,335), BRCA1 (380), et XRCC1 (306,360) ce qui fait d'elle un effecteur potentiel dans les voies de signalisation et de réparation qui impliquent PARP-1. L'un des premiers rapports suggérant que la réponse de la cellule aux lésions de l'ADN pourrait être modulée par une phosphorylation dépendante de la CK2 était le travail de Teitz et al. (494) qui montre, à l'aide d'une lignée cellulaire *Xeroderma pigmentosum* que l'expression de la protéine CK2 est associée à la résistance aux UV. Il a été montré aussi que la liaison de p53 à l'ADN après irradiation UV est activée après sa phosphorylation par la CK2 (239,246,247). D'autre part, la CK2 est connue comme un facteur terminal dans la voie de signalisation pour la répression des gènes codant des protéines de la machinerie de la transcription telles que Pol III (176). La participation de CK2 dans le contrôle de la réparation des lésions de l'ADN a été confirmée par le travail de Loizou et al. (306) qui montre que la phosphorylation de XRCC1 par CK2 est essentielle pour l'assemblage et l'activité des complexes de réparation des CSBs. De plus, l'activité kinase de la CK2 est nécessaire pour l'association du facteur de traitement des extrémités des cassures de l'ADN APLF (*Aprataxin- and PNK-Like Factor*) avec XRCC1 afin d'induire le recrutement des machineries de réparation des CSBs et des CDBs (31,222). Un rôle de CK2 dans la réparation des CDBs est aussi proposé, par la phosphorylation de l'histone H4 des nucléosomes situés à proximité des CDBs. Cette phosphorylation est nécessaire pour la maintenance de l'intégrité du génome, soulignant l'importance des histones comme sites de recrutement des protéines de la réparation (7).

PARP-1 a également été identifiée comme étant un substrat des kinase ILK (*Integrin-Linked Kinase*) (280,338,511) et AMP-K (*AMP-activated protein Kinase*) (524), sa phosphorylation augmentant remarquablement son activité de poly(ADP-ribosyl)ation.

Finalement, une liaison entre PARP-1 et la kinase dépendante des cyclines -5 (cycline-dependent kinase-5, Cdk5) a été proposée suite à la découverte d'une sensibilité exacerbée des cellules dont l'expression de Cdk5 est inhibée par siRNA aux inhibiteurs de PARP (508). Plusieurs sites de phosphorylation de PARP-1 par Cdk5 (serines 782, 785 et 786) ont été

identifiés *in vitro* (168) mais les conséquences cellulaires de ces modifications ne sont pas connues.

L'ensemble de ces données indiquent que la phosphorylation joue un rôle significatif dans la régulation de l'activité PARP-1. Cependant, jusqu'à présent, il n'y a aucun travail indiquant que les deux autres protéines, majeures du métabolisme des PAR, PARP-2 et PARG peuvent être régulées par phosphorylation, bien que des sites de phosphorylation aient été identifiés dans les deux protéines (28,29,168,224,517,520).

2.2. La kinase dépendante des cyclines 5 (Cdk5)

2.2.1. Découverte, structure et localisation de Cdk5

Les kinases dépendantes des cyclines (Cdks) sont une grande famille sérine/thréonine kinases qui, une fois activées par leur association avec les cyclines régulent la progression dans le cycle cellulaire eucaryotique. En 1992, un membre inhabituel de la famille Cdk a été identifié : Cdk5 (207,288,346). Cdk5 est un membre unique de la famille des Cdks dans la mesure où la régulation du cycle cellulaire n'est pas son rôle essentiel et que son activité ne requiert pas son association avec une cycline, bien qu'elle puisse interagir avec la cycline D et E. Cdk5 représente 61 % d'homologie de séquence avec la Cdk2 humaine et la Cdc2 des levures, et 58% d'homologie avec la Cdk1 des souris (207).

Fortement conservée c'est dans le cerveau que Cdk5 est la plus abondante. C'est dans les neurones que son rôle a donc été le plus étudié. Son activité apparaît indispensable pour un développement et une fonction normale des neurones. Mais Cdk5 phosphoryle également un grand nombre de protéines cibles en dehors des neurones impliquées dans des processus cellulaires variés, notamment la transcription, l'apoptose, l'adhésion cellulaire… Il y a également de plus en plus de travaux associant Cdk5 au développement du cancer et à la progression tumorale (95).

Cdk5 est une protéine de 33 kDa codée, chez l'Homme, par un gène de 12 exons situé au niveau du chromosome 7 dans la région q36. L'expression de Cdk5 est régulée par le facteur de transcription δFosB, un membre de la famille des protéines c-jun (117).

Cdk5 est constituée d'un petit lobe N-terminal et d'un grand lobe C-terminal (Figure 21). Le lobe N-terminal est constitué d'un feuillet β et d'une hélice C contenant une séquence polypeptidique PSSALRE (Figure 21). Le lobe C-terminal est de structure hélice α. Entre les deux lobes il y a les sites de liaison avec l'ATP et le substrat (60,322), et une séquence de 20 acides aminés appelée « boucle terminale » (T-loop) activatrice (Figure 21) qui, lorsque la

protéine est inactive, empêche l'accès de l'ATP et du substrat à leur site de liaison (491). La conformation en T-loop joue un rôle important pour faciliter la reconnaissance des substrats à proline en position +1. En effet, Cdk5 est une sérine/thréonine kinase dirigée par une proline (*proline-directed serine/threonine kinase*) en position +1 des sérines/thréonines cibles situées dans des séquences de type (S/T)PX(H/R/K) (476,491).

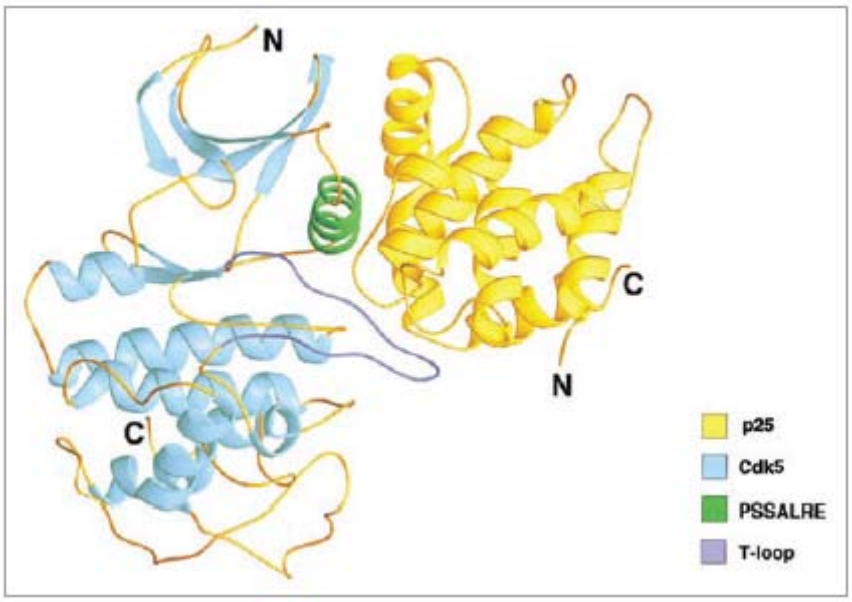


Figure 21 : Structure de Cdk5 liée à sa protéine activatrice p25 (d'après Tarricone et al. (2001) (491) et Lalioti et al. (2010) (272)).

La localisation de Cdk5 dans la cellule ne semble pas avoir un modèle de distribution précis. Sa localisation dépend essentiellement de ses activateurs et substrats (113,255,455).

2.2.2. Activation et régulation d'activité de la Cdk5

Malgré la similitude structurale, l'activation de Cdk5 diffère complètement des autres Cdks (323). L'activation de Cdk5 ne requiert pas une cycline mais une interaction avec les protéines p35/ p39 ou p25.

2.2.2.1. Les activateurs de Cdk5 :

<u>p35/p39 :</u>

p35 (NCK5a : *Neuronal Cdk5 activator*) a été découverte grâce à son association avec Cdk5 et son pouvoir activateur de cette dernière (289,509), alors que p39 (NCK5ai : *neuronal Cdk5 activator isoform*) a été identifié grâce à son homologie de séquence (57%) avec p35 (487). Les études de mutations suggèrent que p39 peut compenser quelques fonctions de p35, mais pas toutes, pouvant ainsi masquer une déficience de p35 (198,392). Les souris doubles

mutantes p35/p39$^{-/-}$ sont phénotypiquement identiques aux souris déficientes en Cdk5, suggérant qu'il n'y a aucun autre activateur direct de Cdk5 et que p35 et p39 sont nécessaires et suffisantes pour activer Cdk5 *in vivo* (255). Ces deux protéines activatrices de Cdk5 n'ont que peu de similitudes de séquences avec les cyclines activatrices classiques des autres Cdks. Cependant, elles ont des domaines tridimensionnels similaires aux motifs de liaison des cyclines avec les Cdks (361).

p35 et p39 sont généralement localisée dans la membrane, une étude a toutefois montré que p35 pouvait être transportée dans le noyau par interaction directe avec des protéines de la famille des importines (166).

p25:

p25 est une protéine de 25kDa issue de la protéolyse de p35 par la calpaïne (*calcium-activated protease*). Contrairement à p35 qui a une vie courte (temps de demi-vie de moins de 20 min), p25 n'est pas dégradée rapidement, elle est plus stable avec un temps de demi-vie deux à trois fois plus long que p35. La liaison de p25 avec Cdk5 induit son activité kinase, change sa localisation cellulaire et module sa spécificité aux substrats. Ainsi, p25 maintient Cdk5 dans un état hyperactif, ce qui est souvent associé à lune neurotoxicité (283,395).

Un fragment similaire à p25, p29, issue du clivage de p39 a été aussi détecté dans les cellules. p29 est connue par sa contribution dans la dérégulation de l'activité de Cdk5 (396).

2.2.2.2. Régulation de l'activité kinase de Cdk5 :

L'activité kinase de Cdk5 est régulée via sa phosphorylation par d'autres kinases sur des sites spécifiques. De même que pour les autres Cdks, l'activité de Cdk5 est régulée par la phosphorylation sur ses thréonines 14 et 15. Cependant, contrairement aux autres Cdks où la phosphorylation inhibe l'activité kinase, la phosphorylation de Cdk5 sur la thréonine 14 inhibe son activité mais sa phosphorylation sur la thréonine 15 l'augmente (118). L'enzyme qui phosphoryle la thréonine 15 des autres Cdks est Wee1, dans le cas de Cdk5, cette thréonine est la cible de la protéine C-Abl (c-Abelson). La stimulation d'activité liée à cette phosphorylation se fait par une augmentation de l'affinité du complexe p35-Cdk5 pour son substrat (557).

Un autre évènement qui induit l'activité maximale des Cdks est la phosphorylation de la thréonine 160. Le résidu équivalent dans Cdk5 est la sérine 159 mais cette phosphorylation de Cdk5 n'est pas obligatoire et peut avoir un effet négatif sur son activité (455). Une différence

similaire a été observée dans la régulation des Cdks par les kinases inhibitrices des cyclines (CKIs). En effet, les deux CKIs p21 et p27 qui inhibent les Cdks mitotiques par inactivation du complexe cycline-Cdk semblent avoir un effet minime sur l'activité de Cdk5 (282).

Une autre propriété spécifique de Cdk5 est son autorégulation. En effet, Cdk5 est capable de phosphoryler p35 au niveau de la sérine 8 et de la thréonine 138. Ces modifications induisent l'ubiquitination de p35 et sa dégradation par les protéasomes (237). Ceci semble être un feedback négatif pour limiter l'activation de Cdk5 par p35 (117).

2.2.3. Les fonctions de Cdk5 dans et en dehors des neurones

Les premières connaissances sur la fonction de Cdk5 sont venues de l'observation de 1) la croissance des neurites dans des cultures corticales et dans des cellules hippocampiques immortalisées après stimulation par transfection de p35 et p39, et de 2) l'inhibition de cette croissance par les mutants dominants-négatifs de Cdk5 ou par des RNAi de p35 et p39 (373,542). Il a également été montré que les souris *Cdk5* $^{-/-}$ et les souris doubles mutantes *p35/p39* $^{-/-}$ souffrent d'une perturbation sévère de la cyto-architecture du cortex cérébral suite aux défauts dans la migration neuronale (77), L'ensemble de ces résultats ont marqué le début de l'identification des protéines et des mécanismes ciblés par Cdk5 dans la cellule. Ces découvertes ont initialement fait du système nerveux en développement et des cellules neuronales cultivées les modèles préférés pour évaluer les effets *in vivo* de l'inactivation des voies impliquant le complexe Cdk5-p35/p39 (272,555). Cdk5 phosphoryle un grand nombre de protéines cibles dans les neurones, jouant un rôle surtout dans la morphologie et la motilité cellulaire. La dérégulation de Cdk5 a été impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives, incluant les maladies d'Alzheimer de Parkinson et d'Huntington, ainsi que dans la sclérose amyotrophique latérale et l'ischémie cérébrale focale (180,456,488).

La démonstration que Cdk5 est actif dans pratiquement tous les tissus (434) a étendu la recherche aux tissus non-neuronaux ce qui a conduit à découvrir son implication dans une large variété de fonctions cellulaires non neuronales. Cdk5 active a été retrouvée dans l'ovaire (281), les cellules pancréatiques β (530), les testicules (433), les cellules épithéliales cornéennes (170), et les monocytes (165). Actuellement, il y a de plus en plus de travaux qui rapportent des rôles de Cdk5 en dehors des neurones, dans des processus aussi variés que l'exocytose, la myogenèse, la différenciation, la migration, l'adhésion, l'angiogenèse, la transcription, la traduction, la réponse aux dommages de l'ADN ou encore la sénescence et l'apoptose (95,555).

De plus, plusieurs études récentes indiquent que la dérégulation de Cdk5 pourrait être associée au développement tumoral (95,555).

Cdk5 et le cancer :

Feldmann et al. (154) ont rapporté la présence de complexe Cdk5-p35 actif dans des cellules de cancer du pancréas et ont montré que l'inhibition de Cdk5 diminue la croissance de la tumeur et la progression métastatique des cancers pancréatiques.

Un autre lien entre Cdk5 avec le cancer vient de l'observation de la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 qui régule son activité (165). STAT3 peut être phosphorylée sur la sérine 727 dans des cellules de cancer de la thyroïde, conduisant à l'augmentation de la prolifération cellulaire. A l'inverse, une inhibition de Cdk5 dans des souris *nude* retarde la croissance de la tumeur de manière dépendante de la phosphorylation de STAT3 (297).

Cdk5 peut jouer un rôle aussi dans le cancer du sein, les cellules MCF-7 et MDAMB321 présentent une diminution de prolifération après inhibition de Cdk5 par un inhibiteur chimique (Roscovitine) ou un siRNA. L'utilisation de Carboplatine, une drogue chimiothérapique du cancer du sein, induit l'activité de Cdk5 en augmentant l'activité d'ERK en réponse aux dommages de l'ADN (514). L'activation de Cdk5 stimule également la stabilisation de p53, pouvant causer la mort cellulaire en réponse aux dommages d'ADN causés par le Carboplatine (514).

D'autres travaux ont montré que l'activité Cdk5 est nécessaire pour contrôler la motilité cellulaire et le potentiel métastatique de cellules du cancer de la prostate (482). Dans ce même modèle, Hsu et al. ont décrit une régulation de la prolifération des cellules cancéreuses induite par la phosphorylation du récepteur aux androgènes par Cdk5 (216).

En plus de son influence sur la migration et la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de son activité kinase, la protéine Cdk5 pourrait également être impliquée dans le cancer comme facteur de risque ou de mauvais pronostic.

Par exemple, Liu et al. ont montré qu'il existe quelques patients atteints d'un cancer du poumon qui présentent une corrélation significative entre le niveau d'expression de Cdk5-p35 et le degré de différenciation et de métastase aux ganglions lymphatiques (303). Une autre étude a montré que la présence de polymorphismes dans le promoteur Cdk5 augmente le risque du cancer du poumon dans une partie spécifique de la population coréenne (84). Les mécanismes restent inconnus mais ces observations suggèrent un rôle de Cdk5 dans la réponse aux dommages de l'ADN.

2.2.4. Le rôle de Cdk5 dans la réponse aux dommages de l'ADN

Plusieurs études récentes indiquent que Cdk5 joue un rôle direct et important dans la modulation de la réponse aux dommages de l'ADN dans les neurones. Il est connu que les dommages de l'ADN stimulent l'activité protéase de la calpaïne générant, par clivage de la p35, l'activateur potentiel de Cdk5, la p25. Ainsi, l'activité de Cdk5 augmente dans des phases précoces de la réponse aux lésions de l'ADN (310). Cette activation a pour but de réguler, par phosphorylation, l'activité et/ou le mode d'action de différentes protéines de signalisation et/ou de réparation des dommages de l'ADN.

Parmi les substrats de Cdk5 impliqués dans la réparation la kinase *phosphatidylinositole-3-kinase-like*, ATM a été identifiée (500). ATM est une sérine/thréonine kinase qui joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome par phosphorylation de multiples protéines cruciales pour le bon fonctionnement de différents processus cellulaires. En effet, les substrats d'ATM sont impliqués dans la réponse apoptotique (p53 et CHK2 (*Kinase checkpoint 2*)), le contrôle du cycle cellulaire (p53, FANCD2, HDM2, SMC1, CHK1 et CHK2) et la réparation de l'ADN (BLM, Artemis, c-Abl, BRCA1, H2AX, 53BP1, MDC1, CHK1, CHK2, le complexe Mre11-Rad50-NBS1 et SMC1) (336,459). Tian et al. (500) ont montré que les dommages induits par la Campthothécine (CPT) induisent le clivage calpaïne-dépendant de p35 en p25, ce qui conduit à l'activation de Cdk5. Cdk5, a son tour, phosphoryle ATM sur la sérine 794, induisant l'autophosphorylation de la sérine 1981 nécessaire pour l'activité kinase d'ATM. Le signal Cdk5-ATM régule la phosphorylation et les fonctions des cibles d'ATM, p53 et H2AX. L'inhibition de l'activité de Cdk5 à l'aide de l'inhibiteur Roscovitine ou de RNAi inhibe la phosphorylation d'ATM au niveau des deux sérines, 794 et 1981, bloque l'entrée des cellules neuronales dans le cycle cellulaire et empêche l'expression des gènes des cibles de p53, PUMA et Bax protégeant ainsi les neurones de la mort apoptotique induite par les dommages de l'ADN. Cdk5 peut aussi interagir directement avec p53 suite à l'induction des dommages par la mitomycine C (500). De plus, la phosphorylation de p53 par Cdk5 sur les sérines 15, 33 et 46 augmente sa stabilisation et induit la trans-activation des gènes cibles de p53 (Lee et al. 2007).

APE1 est un autre substrat de Cdk5 impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN. Huang et al. (217) ont montré, *in vitro*, que les deux complexes p25/Cdk5 et p35/Cdk5 peuvent phosphoryler APE1 sur la thréonine 232, réduisant ainsi son activité AP endonucléase et interférant avec ses fonctions dans la réparation.. La forme phosphorylée d'APE1 a été retrouvée dans les noyaux des neurones post-mortem des patients atteints de la

maladie de Parkinson et d'Alzheimer (217), suggérant que des défauts de la fonction d'APE1 pourraient contribuer au processus pathogénique de certaines maladies neurodégénératives.. Il a été montré, par exemple, que sous des conditions normales, la phosphorylation de la protéine anti-apoptotique Huntingtin par Cdk5 sur les sérines 1181 et 1201 protège les neurones contre la toxicité induite par les dommages de l'ADN (14).

De plus, Cdk5 inhibe par phosphorylation de sa thréonine 89, l'activité de l'enzyme anti-oxydante péroxirédoxine 2 (Prx2), ce qui conduit à l'augmentation du stress oxydatif. Ces modifications pourraient être impliquées dans la maladie de Parkinson (217).

Turner et al. (508) ont rapporté pour la première fois une implication de Cdk5 dans la réponse aux dommages dans des cellules non-neuronales. Ils ont montré que la déplétion en Cdk5 par siRNA augmente la sensibilité des cellules CAL51, dérivées d'un cancer du sein, aux inhibiteurs de PARP et en induit la formation spontanée de CDBs, ceci montre l'importance de Cdk5 pour la stabilité de l'ADN génomique.

2.2.5. Le rôle de Cdk5 au niveau de la chromatine

La phosphorylation de la chromatine et des protéines chromatinienne est de grande importance pour de nombreux processus cellulaires. Il peut y avoir phosphorylation des histones sur les sérines et les thréonines. La phosphorylation de la queue N-terminale de l'histone H3 est globalement associée à l'activation de la transcription (134,378). D'autre part, plusieurs phosphorylations sont impliquées dans la réparation de l'ADN. La phosphorylation de la sérine 139 de H2AX, mais aussi des phosphorylations de H4 (sérine 1) et H2A (sérine 129) sont impliquées dans la réparation par la voie NHEJ. De plus des résidus phosphorylés sur H3 (sérine 10 et thréonine 3) sont requis au cours de la mitose pour le déplacement de la protéine HP1 et l'alignement des chromosomes en métaphase.

A ce jour, peu de données sont disponibles sur l'implication de l'activité kinase de Cdk5 dans le remodelage de la structure chromatinienne et il n'a pas été montré de phosphorylation des histones par Cdk5. Une seule protéine chromatinienne, non histone a été identifiée comme une cible de l'activité kinase de Cdk5, il s'agit de HMGB1 (*high mobility group box 1*). Cdk5 phosphoryle HMGB1 sur la sérine 180 ce qui promeut sa liaison à l'ADN (510) et provoque des changements structurels qui induisent le recrutement des facteurs de transcription (309). Il est connu que Cdk5 peut aussi affecter l'intégrité de la chromatine et l'ADN indépendamment de son activité kinase. En effet, le complexe p25/Cdk5 peut interagir directement avec HDAC1 (*Histone déacétylase 1*) et inhiber son activité (248). Les HDACs régulent la structure de la chromatine et l'expression des gènes par enlèvement des groupements acétyles

des histones, ce qui diminue l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN. L'inhibition de la fonction de HDAC1 par interaction avec p25/Cdk5 dans les neurones est corrélée à une accumulation de dommages de l'ADN (CDBs), une dérégulation du cycle cellulaire et la mort des neurones.

Toutefois, on ignore toujours si Cdk5 a un rôle direct dans le remodelage et/ou la dynamique de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN.

Résultats et Discussions

1ère partie : Impact de la déplétion deCdk5 sur l'activité poly(ADP-ribose)polymérase et la réponse aux radiations

I. Introduction.

L'étude des rôles des PARPs, en particulier PARP-1, dans les mécanismes de réparation des dommages de bases et des CSBs (BER et SSBR), et leur importance dans la réponse aux radiations ionisantes, étaient depuis quelques années l'un des axes principaux de recherche du laboratoire. En effet, l'un des résultats majeurs de ces études était la mise en évidence de différentes conséquences entre l'inhibition de l'activité de PARP-1 et l'absence de la protéine par déplétion sur la réparation des CSBs et la radiosensibilité sur un modèle de cellules humaines (HeLa) (179). Ces études avaient pour but la mise en évidence du potentiel de PARP-1 comme cible thérapeutique dans le traitement des cancers. Afin de bien explorer ce potentiel il était impératif de comprendre, non seulement le rôle de PARP-1 et l'effet de sa déplétion ou de son inhibition sur le BER et le SSBR, mais aussi comment son activité et son recrutement au site du dommage sont régulés. Plusieurs études ont montré que l'activité de PARP-1 peut être régulée via sa phosphorylation (168) (Introduction générale § IV.2.1). La Cdk5 est l'une des kinases qui semble être impliquée dans cette régulation. Il a été montré que les cellules dépourvues de Cdk5 : 1) présentent une plus grande sensibilité aux inhibiteurs de PARPs (concept de létalité synthétique), 2) induisent une formation spontanée des CDBs qui sont réparées normalement (508). Ces données nous ont conduit à se poser les questions suivantes : la sensibilité aux inhibiteurs de PARPs provient-elle d'un défaut dans la(es) voie(s) de réparation des CSBs? Dans ce cas, la voie impliquée est-elle le BER et/ou le SSBR ? La déplétion de Cdk5 a t-elle un impact sur l'activité et le recrutement des protéines de BER après photo-dommages, en particulier PARP-1 ? Quel est l'effet de la déplétion de la Cdk5 sur la cinétique de réparation des CSBs ? Les cellules Cdk5 sont-elles sensible aux RI ?

Afin de répondre à ces questions nous avons eu recours à plusieurs approches. Grâce à une collaboration avec le Dr. Denis Biard, nous avons pu étudier différents clones de la lignée HeLa invalidés de façon stable Cdk5. La technique adoptée par le Dr. Denis Biard est basée sur la transfection stable de la lignée HeLa parentale avec des vecteurs pEBV (Epstein-Bar Virus) contenant des séquences codantes des shRNA (short hairpin RNA) dirigés contre les ARNm d'intérêt. Le clone appelé Contrôle est transfecté avec le vecteur pEBV contenant une séquence codante d'un shRNA inefficient (36,37).

En utilisant ces cellules invalidées pour Cdk5 au moyen de shRNA ($Cdk5^{KD}$) nous avons, dans un premier temps, validé par des tests de survies clonogéniques la létalité synthétique due à l'inhibition de l'activité PARP et déterminer la radiosensibilité des cellules $Cdk5^{KD}$.

Dans un deuxième temps nous avons étudié après photo-dommages les cinétiques de recrutement de PARP-1 et XRCC1, impliquées dans le SPR, et de PCNA, impliquée dans le LPR. Ces cinétiques de recrutement ont été étudiées, après transfection des cellules (Contrôles et $Cdk5^{KD}$) par le plasmide d'intérêt couplé à la GFP, par vidéo-microscopie après induction des dommages d'ADN localisées par micro-irradiation en utilisant un laser à 402 nm.

La troisième étape de ce travail était la mesure de l'activité PARP et du niveau des PARs dans les cellules Contrôles et $Cdk5^{KD}$avant et après induction de dommages. Deux méthodes différentes ont été exploitées : la mesure colorimétrique des niveaux de NADPH, inversement proportionnelle à l'activité PARP, et la détection des polymères formés par un test d'immunofluorescence. Parallèlement, nous avons mesuré dans les mêmes cellules l'activité de la PARG. L'activité PARG a été mesurée à l'aide d'un kit Trevigen.

L'effet de la déplétion de Cdk5 sur la cinétique de réparation des CSBs a été étudié par l'analyse de l'incidence et des cinétiques de religation des CSBs radio-induites dans les cellules Contrôles et $Cdk5^{KD}$.

Globalement, cette étude nous à permis de montrer que :

- les cellules $Cdk5^{KD}$ sont sensibles à l'effet létal des RI.
- la déplétion de Cdk5 module l'activité et le recrutement de PARP-1 et de PCNA au site du dommage de l'ADN.
- les cellules $Cdk5^{KD}$sont capables de religuer les CSBs avec des cinétiques comparables à celles des cellules Contrôles. Cette réparation passe éventuellement par la voie du LPR.

II. Résultats

Article n° 1: The impact of Cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP ribose) polymerase activity and responses to radiation

Cell. Mol. Life Sci.
DOI 10.1007/s00018-011-0811-6

Cellular and Molecular Life Sciences

RESEARCH ARTICLE

The impact of cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP-ribose) polymerase activity and responses to radiation

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

Received: 31 May 2011 / Revised: 3 August 2011 / Accepted: 25 August 2011
© The Author(s) 2011. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) has been identified as a determinant of sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. Here, the consequences of its depletion on cell survival, PARP activity, the recruitment of base excision repair (BER) proteins to DNA damage sites, and overall DNA single-strand break (SSB) repair were investigated using isogenic HeLa stably depleted (KD) and Control cell lines. Synthetic lethality achieved by disrupting PARP activity in Cdk5-deficient cells was confirmed, and the $Cdk5^{KD}$ cells were also found to be sensitive to the killing effects of ionizing radiation (IR) but not methyl methanesulfonate or neocarzinostatin. The recruitment profiles of GFP-PARP-1 and XRCC1-YFP to sites of micro-irradiated $Cdk5^{KD}$ cells were slower and reached lower maximum values, while the profile of GFP-PCNA recruitment was faster and attained higher maximum values compared to Control cells. Higher basal, IR, and hydrogen peroxide-induced polymer levels were observed in $Cdk5^{KD}$ compared to Control cells. Recruitment of GFP-PARP-1 in which serines 782, 785, and 786, potential Cdk5 phosphorylation targets, were mutated to alanines in micro-irradiated Control cells was also reduced. We hypothesize that Cdk5-dependent PARP-1 phosphorylation on one or more of these serines results in an attenuation of its ribosylating activity facilitating persistence at DNA damage sites. Despite these deficiencies, $Cdk5^{KD}$ cells are able to effectively repair SSBs

The authors Celeste Bolin and Mohammed-Tayyib Boudra contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00018-011-0811-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

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

C. Bolin · M.-T. Boudra · M. Fernet · L. Vaslin · V. Pennaneach · T. Zaremba · V. Favaudon · F. Mégnin-Chanet · J. Hall (✉)
Inserm, U612, Bât. 110-112, Centre Universitaire,
91405 Orsay Cedex, France
e-mail: janet.hall@curie.fr

M.-T. Boudra
Faculté de Médecine, Université Paris-XI,
94270 Le Kremlin Bicêtre, France

D. Biard
Commissariat à l'Energie Atomique,
DSV-iRCM/INSERM U935, Institut A. Lwoff-CNRS,
BP 8, 94801 Villejuif Cedex, France

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

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

Present Address:
C. Bolin
Department of Biological Sciences, Boise State University,
1910 University Drive, Boise 83725, ID, USA

Published online: 16 September 2011

probably via the long patch BER pathway, suggesting that the enhanced radiation sensitivity of Cdk5^{KD} cells is due to a role of Cdk5 in other pathways or the altered polymer levels.

Keywords Base excision repair · Cdk5 · DNA repair · Ionizing radiation · Poly(ADP)ribose polymerase-1

Introduction

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is a highly abundant early response sensor of DNA single-strand breaks (SSBs). It binds to SSBs and certain other forms of DNA strand breaks and catalyzes the transfer of poly(ADP-ribose) (PAR) chains from NAD^+ onto itself and several other protein targets, generating a scaffold that is involved not only in DNA damage signaling and repair but also the modification of chromatin structure, transcription, RNA metabolism, cell death, and cell-cycle regulation (for review, see [1]). The absence or inhibition of PARP-1 has been shown in a variety of human cells and mouse models to result in a hypersensitivity to the cell-killing effects of DNA-damaging agents including ionizing radiation (IR) (see [2] and references therein). In addition, PARP inhibition in certain genetic backgrounds can result in hypersensitivity through a mechanism of synthetic lethality [3, 4]. Therefore, determining how PARP-1 is regulated is imperative for understanding not only its normal cellular functions but also its potential as a cancer therapeutic target.

Several studies in vitro and in vivo have suggested that PARP-1 activity itself may be regulated via phosphorylation at several sites and thus PARP-1 signaling in DNA repair pathways could also be modulated by phosphorylation. The kinases implicated include protein kinase C (PKC) α and β, extracellular signal-related kinases 1 and 2 (Erk1/2), c-Jun-N-terminal kinase 1 (JNK1), calmodulin kinase (CamK)-II, integrin-linked kinase (ILK), AMP-activated protein kinase (AMP-K), and cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) ([5] and references therein). A link between Cdk5 and PARP-1 was identified by Turner et al. [6] in a siRNA screen to identify kinases sensitizing cells to a PARP inhibitor. This serine/threonine kinase has distinct cellular roles as compared to other members of the large family of Cdks and is known to function in a neuronal cell context where it is essential for neuronal cell-cycle arrest and differentiation [7]. Turner et al. [6] showed that the Cdk5-silenced cells, in addition to an increased sensitivity to the cell-killing effects of PARP inhibitors, were also sensitive to the DNA-damaging agents camptothecin and cisplatin. Additionally, while Cdk5 silencing induced spontaneous formation of DNA double-strand breaks (DSBs) and markers of DSB repair, it was not required for early DSB signaling or DNA DSB repair. However, Cdk5 was found to be necessary for the activation of cell-cycle DNA-damage checkpoints and in particular the intra-S and G2/M cell-cycle checkpoints [6]. The mechanisms for these failed checkpoint activations are still not fully understood, but the background of greatly increased SSBs would be expected to lead to increased replication fork collapse and subsequent cell death.

In the present study, we have examined the impact of the stable depletion of Cdk5 on cell survival after exposure to the PARP inhibitor 2-[(*R*)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) [8], methyl methanelsulfonate (MMS), neocarzinostatin (NCS), and IR. We have also investigated the impact of Cdk5 depletion on PARP activity, the recruitment of PARP-1, and other base excision repair (BER) proteins to sites of localized DNA damage and the overall capacity of Cdk5^{KD} cells to repair IR-induced SSBs. The Cdk5-depleted cells displayed enhanced sensitivity to PARP inhibition confirming the results of Turner et al. [6], but of the panel of DNA-damaging agents tested, they only showed increased sensitivity to the cell-killing effects of IR compared to the response seen in the Control cells. These results suggest that there is an alteration in SSB processing in the Cdk5^{KD} cells. Supporting this finding, we found that the persistence of GFP-tagged PARP-1 and YFP-tagged XRCC1 at sites of DNA damage was reduced in Cdk5^{KD} cells and also that a PARP-1-GFP mutated at potential Cdk5 phosphorylation sites showed an altered DNA-damage recruitment profile in comparison to the Control cells. These results would suggest that Cdk5 modulates PARP-1's activity and are supported by our finding that the Cdk5^{KD} cells had higher basal and DNA damage-induced levels of polymer. Despite these differences in PARP-1 recruitment, the Cdk5^{KD} cells were capable of religating all SSBs generated by IR, perhaps through a mechanism requiring PCNA, as the recruitment of GFP-tagged PCNA was found to be higher to localized damage sites in Cdk5^{KD} cells compared to Control cells. These results suggest that the underlying molecular cause of the radiation sensitivity seen in the Cdk5^{KD} cells is not the inability to repair either SSBs, nor DSBs generated directly, but may be due to the processing of IR-induced DNA damage in a replicating cell and the involvement of Cdk5 and/or PARP-1 in this process.

Materials and methods

Cell lines and gene silencing

shRNA sequences were designed with the DSIR program that also operates an exact similarity search algorithm for potential off-target detection [9]. Cloning in pEBVsiRNA

vectors carrying a hygromycin B resistance cassette and establishment of stable knockdown and Control HeLa clones were carried out as previously described [10]. HeLa cells carrying the pBD650 plasmid that expressed an inefficient shRNA sequence were used as Controls [10]. The RNAi-targeted sequence for Cdk5 (NM_004935) was nucleotides 703–721 and was used to generate the $Cdk5^{KD}$ cells (clone 1499) used throughout this study, for PARP-1 (NM_001618) nucleotides 2,068–2,086 and for DNA-PKcs (NM_006904) nucleotides 5,980–5,998 [11]. Two additional Cdk5-depleted HeLa clones were generated where the RNAi-targeted sequences were nucleotides 455–473 generating clone 1,500, and nucleotides 41–59 generating clone 1,501. These two clones were used in the experiments presented in supplementary Fig. 4 only. All HeLa clones were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin in the presence of 125 µg/ml hygromycin B under 5% CO_2 in air. All tissue culture reagents were from Invitrogen.

Western blotting

Western blots of total cell extracts prepared using the M-PER reagent (Pierce, Perbio Science) containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors were carried out using precast NuPAGE® Novex 4–12% Bis–Tris gels (Invitrogen) as previously described [12]. The nitrocellulose membranes were blocked with either 5% bovine serum albumin or 5% nonfat milk (PARP-1 only) for 1 h at room temperature and then incubated with primary antibodies directed against PARP-1 (clone C2-10, BD Pharmingen, BD Biosciences) or Cdk5 (clone C-8, Santa Cruz) overnight at 4°C and with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 1 h at room temperature. Membranes were probed with an enhanced chemiluminescence reagent and re-hybridized with α-tubulin antibody (clone DM1A, Sigma-Aldrich) for normalization.

Expression plasmids and transfection

pEGFP-NLS-PCNA, pEGFP-PARP-1, and XRCC1-pEYFP plasmids were kindly provided by Drs. P. Kannouche (FRE2939 CNRS, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France), V. Schreiber (UMR7175 CNRS, ESBS, Illkirch, France), K. W. Caldecott (Genome Damage and Stability Centre, University of Sussex, Brighton, UK), and P. Radicella (IRCM, CEA-DSV, Fontenay-aux-Roses, France), respectively. Plasmids were purified using a Macherey–Nagel NucleoBond® PC 500 EF kit. The three potential Cdk5 phosphorylation sites at serines 782, 785, and 786 (782-SDDSS-786) in PARP-1 were mutated in the pEGFP-PARP-1 plasmid to alanine residues (782-ADDAA-786) using the Stratagene QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit PARP-1 S782-785-786A and the following primers:

PARP-1 S782-785-786A forward
5′-CTGCTCAGGGGAGGGGCTGATGATGCCGCCA
AGGATCCCATCGATG-3′
PARP-1 S782-785-786A reverse
5′-CATCGATGGGATCCTTGGCGGCATCATCAGCC
CCTCCCCTGAGCAG-3′.

The PCR conditions were: 95°C-2′; (95°C-1′, 55°C-1′, 65°C-10′) 20 cycles, 65°C-10′, and then a hold at 10°C until further processing, using a Veriti™ 96-well thermal cycler. The PARP-1 coding region of the mutated plasmid was resequenced before use in eight fragments (full details on request) using the BigDye® Terminator v1.1 cycle sequencing kit. Twenty-four hours before transfection, cells were plated at 50% confluence onto 25-mm round coverslips and transfected 48 h before the live-cell experiments using JET PEI (Polyplus transfection, Ozyme) according to the manufacturer's recommendations.

Clonogenic cell survival assays

Control (1×10^3), $PARP\text{-}1^{KD}$, $DNA\text{-}PKcs^{KD}$, $Cdk5^{KD}$ (2×10^3) cells were plated in 25-cm^2 flasks in triplicate, and allowed to adhere for 3–5 h at 37°C. For the inhibition of Cdk5 activity, cells were then grown for 24 h in the presence of 10 µM roscovitine (Sigma-Aldrich) in 1% DMSO, and for the inhibition of PARP activity cells for 24 h in the presence of 10 µM ABT 888 (Alexis Biochemicals) in 1% DMSO. For the assessment of cell survival after treatment with DNA damaging agents, cells were either treated with increasing concentrations of MMS (Sigma-Aldrich) for 1 h or NCS added directly to the medium. After all drug treatments, except NCS, which is rapidly degraded in tissue culture medium, cells were washed with Hank's balanced salt solution and drug-free medium added. γ-Ray irradiation for the determination of clonogenic radiation survival was performed at room temperature in culture medium using an IBL-637 (^{137}Cs) irradiator (CIS-Biointernational) at a dose rate of 0.70 Gy/min as previously described [12].

Colonies were allowed to grow for 10–15 days, before fixing with methanol, staining with Coomassie, and counting. Small colonies (<50 cells) were disregarded. The colony count relative to mock-irradiated cells (S) was adjusted for best fit to an exponential ($\mathrm{Ln}\, S = -\alpha \cdot D$) (for the treatment of $DNA\text{-}PKcs^{KD}$ cells with NCS) or to the classical linear-quadratic equation ($\mathrm{Ln}\, S = -\alpha \cdot D - \beta \cdot D^2$) (all other treatments) where D is the treatment dose and α and β adjustable parameters characterizing the response. Calculations were made through non-linear

least-squares regression taking all data points into account, using Kaleidagraph software (Synergy Software).

Live-cell videomicroscopy

Live-cell videomicroscopy was carried out as previously described [12]. DNA photodamage was generated using a 405-nm laser line (diode) set to maximum output for 500 ms and focused onto a single spot of constant size (176 nm) within the nucleus to generate a point of photodamage with a constant amount of energy. Recruitment of the protein of interest was then monitored by fluorescence using the same setting as for the pre-damage sequence. Nomarski contrast images were taken in parallel. Images were captured at intervals of 2–5 s.

Photodamage kinetics were analyzed under the ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997–2011) using an in-house developed macro. Data extraction is a semi-automated process where the user is first invited to draw two regions of interest (ROI): a nuclear region and the site of photodamage. The background ROI is automatically set to the inverse of the nuclear ROI. For each time point, the integrated intensity is extracted from the three ROIs. Intensity from the photodamage site is corrected for both the observational photobleaching and background, and normalized so that its intensity at start-up equals 1: corrected intensity = ((focus intensity (t)−background intensity(t) × focus area/background area) × nuclear intensity(t))(focus intensity(t_0) × nuclear intensity(t_0). The timepoint of induction of the photodamage is extracted from the normalized curve by determining when the maximum change in intensity is achieved between two successive images. The normalized time course from the damage on was fitted to a mono-exponential recovery of the form $y = a\ (1-\exp(-b \times t) + c$, which allows the estimation of the half-time maximum recruitment ($t_{1/2} = -\ln((a + c)/2 \times a)/b$) as well as the expected maximum recruitment (max $= a + c$).

Detection of PAR formation by immunofluorescence

For the detection of polymer formation after exposure to IR, cells were plated onto glass coverslips in six-well plates and 48 h later were exposed to 8 Gy delivered over 3 min. Three min after the end of the irradiation, cells were fixed (4% formaldehyde in PBS for 25 min). Cells were then washed three times with PBS containing 0.1% Triton X-100, rinsed with PBS alone, and re-washed once with PBSMT (PBS with 2% milk, 0.5% Triton X-100). After blocking (30 min, room temperature in PBSMT) cells were incubated with a primary antibody against poly(ADP-ribose) polymers (Trevigen, clone 10HA, 1/400 dilution in PBSMT) for 1 h at 37°C. For the detection of PAR formation after exposure to H_20_2, the growth medium of the plated cells was replaced by PBS alone or by PBS containing 1 mM H_20_2 (Sigma-Aldrich). After a 10-min treatment and a wash with PBS, cells were fixed (2% paraformaldehyde, 0.1% Triton X-100 in PBS for 20 min). Cells were then washed three times with PBS containing 0.1% Triton X-100 and once with TBSAT (TBS with 1% BSA, 0.5% Triton X-100) and then incubated with the same primary antibody as above. Following washing, the slides were incubated with AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, 1/500 dilution for 1 h at RT). After washing, coverslips were mounted with Vectashield containing DAPI 1.5 µg/ml (Vector Laboratories). Images of fields were acquired on a Leica confocal SP5 system, with a 63× objective (line average of four). At least 200 cells were analyzed per experimental condition. The global fluorescence intensity by nucleus was quantified in arbitrary units (AU) using a macro with the Image J software.

Measurements of NAD(P)H levels

Changes in the intra-cellular levels of NAD(P)H following H_2O_2 treatment were monitored as previously described using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) solution (Dojindo Laboratories) [13]. Briefly, 1×10^4 cells were plated in a 96-well plate in 100 µl of growth medium. The next day, the cells were treated with a range of H_2O_2 doses, in the presence of 10 µl of CCK-8 solution. The absorbance at 450 nm was measured 4 h after the start of treatment and the changes in NAD(P)H levels were calculated as a percentage of the absorbance in the absence of H_2O_2 treatment. Measurements were done in quadruplate.

Measurements of PARG activity

PARG activity was measured in cell extracts using a commercially available kit (HT Chemiluminescent PARG Assay Kit, Trevigen) according to the manufacturers' instructions. Briefly, the relative PARG activity in cell extracts was measured by quantification of the loss of biotinylated PAR from histones attached to strip wells in a 96-well format.

Analysis of SSB repair by alkaline filter elution

Radiation-induced SSBs were measured by alkaline filter elution over polycarbonate filters as previously described [12] based on the technique of Filipski and Kohn [14], which allows the titration of direct SSBs, alkali-labile and abasic sites altogether. In brief, cells were grown in the presence of [2-^{14}C] thymidine (0.05 µCi/ml) (Perkin-Elmer) for 36 h. The medium was then replaced and the cells were returned to the incubator for at least 2 h before

exposure to 5 Gy gamma rays at a dose rate of 2.64 Gy/min, at room temperature. Cells were returned to the incubator for fixed times to allow strand break repair to occur. For the determination of the initial yield of SSBs, irradiation was performed on ice to prevent SSB rejoining. At the end of the incubation period, the flasks were rapidly rinsed once with ice-cold PBS-10 mM EDTA, and maintained on ice for not more than 5 min before harvesting with the aid of a cell scraper. An amount of 8×10^5 cells were deposited onto polycarbonate filters, then lysed, and the DNA fragments were eluted and counted. Each measurement was performed in duplicate. The results shown in Fig. 5 were fitted to the exponential equation,

$$R = R_\infty - (R_\infty - R_0)e^{-\alpha t}$$

where R, R_0, R_∞ are the percentages of DNA retained on filters at time t, at time zero and at completion of the reaction, respectively.

Statistics

A non-parametric Mann–Whitney U test was performed using StatEL (AD Science, Paris, France) on paired data sets to assess differences between survival curves (Fig. 1). All data presented in the other figures was analyzed with Prism GraphPad 5.0b software (GraphPad Software Inc.) using unpaired t tests with p being the calculated error risk.

Results

The loss of Cdk5 expression results in increased sensitivity to PARP inhibition and the killing effects of IR

In order to investigate whether Cdk5 depletion has a direct impact on PARP-1 activity and sensitivity to a panel of DNA-damaging agents, we established a stably depleted Cdk5 HeLa cell line (Cdk5^{KD}) using an RNAi system that targeted nucleotides 703–721. These Cdk5^{KD} cells (clone 1,499) were cultivated for more than 80 days in culture with levels of the targeted proteins remaining below 30%, as assessed by the quantification of Western blots, of that seen in Control cells (Fig. 1a). A similar low level of Cdk5 protein expression was seen in two additional Cdk5-depleted clones, 1,500 and 1,501, in which nucleotides 455–473 and 41–59 were targeted, respectively (supplementary Fig. 4f).

The depletion of Cdk5 resulted in a significant increase in the sensitivity to cell killing following treatment with the PARP inhibitor ABT888 for 24 h compared to the response seen in Control cells under the same experimental conditions ($p < 0.004$) (Fig. 1b). In parallel experiments,

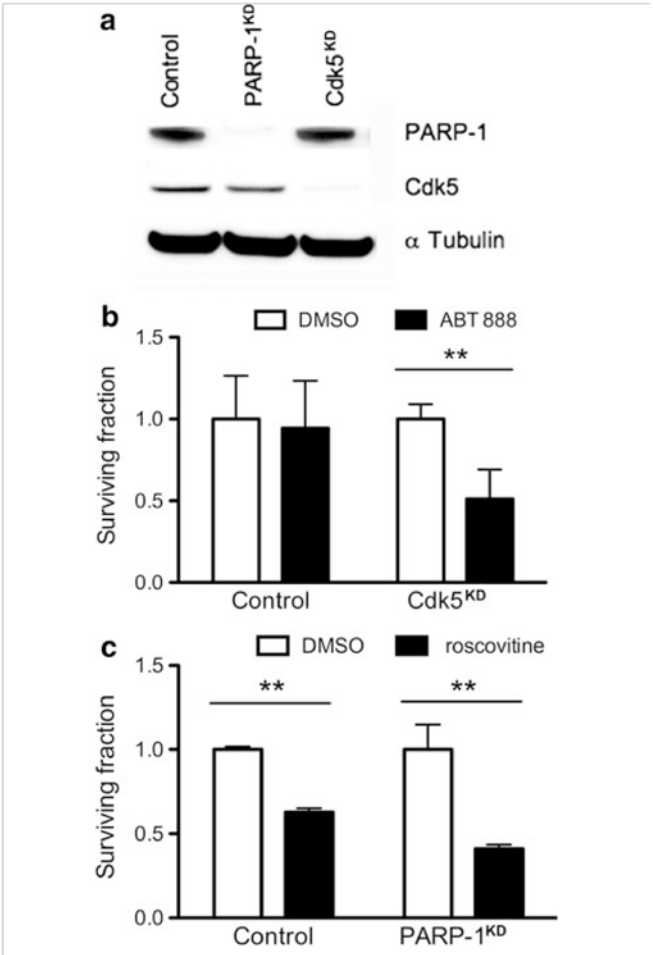


Fig. 1 Clonogenic cell survival of Cdk5-depleted HeLa cells. **a** Western-blot analysis confirming stable depletion of Cdk5 or PARP-1 expression in Cdk5 ^{KD} and PARP-1^{KD} cells, respectively. **b** Clonogenic cell survival of Control or Cdk5^{KD} cells after exposure to DMSO or the PARP-1 inhibitor ABT888 (10 μM, 24 h). **c** Clonogenic cell survival of Control or PARP-1^{KD} cells exposed to DMSO or the Cdk5 inhibitor roscovitine (10 μM, 24 h). Data represents mean ± SD, for at least two independent experiments in triplicate for all conditions $^{**}p < 0.004$

comparing the survival of Control and HeLa cells depleted for PARP-1 cells after treatment with 10 μM of roscovitine for 24 h, an inhibitor of Cdk activity, a significantly lower survival was seen in the PARP-1^{KD} cells ($p < 0.002$) (Fig. 1c). These results confirm those of Turner et al. [6] that synthetic lethality occurs when PARP and Cdk5 activity are both disrupted in stably depleted non-neuronal cell lines and lends support to a model that the DNA damage response is modified when both activities are compromised.

In order to further characterize the Cdk5^{KD} cells, we compared the killing effects of a panel of three DNA-damaging agents, MMS, NCS, and IR, in these cells to that seen in unsynchronized cell populations of Control cells or cells invalidated for PARP-1 or DNA-PKcs. The different

combinations were chosen to generate a spectrum of DNA lesions in backgrounds where different repair pathways are compromised. The base damage formed after exposure to MMS will either be eliminated from the DNA by spontaneous depurination or will be actively repaired through the action of glycosylases such as 3-methyladenine glycosylase and then through the later stages of the BER pathway [15]. NCS is a complex consisting of a dodecadiyne antibiotic (NCS_{Chrom}) reversibly bound to a carrier protein. NCS_{Chrom} cleaves DNA through a suicide reaction, leaving no residual active drug after a few minutes of incubation. The major DNA lesions induced by NCS_{Chrom} in DNA result from radical attack [16] and consist of a blunt end break with a thymidine-5′-aldehyde residue on one strand, with an atypical abasic site at two-nucleotide interval on the complementary strand. This NCS-induced damage is rapidly converted into DSBs in living cells and thus NCS is considered to be a DSB-inducing agent. Finally, IR generates a variety of DNA base adducts, SSBs, and DSBs, as well as complex DNA lesions.

$Cdk5^{KD}$ and PARP-1^{KD} cells were found to be approximately 1.6 times more sensitive to the killing effects of IR than Control cells, based on the surviving fraction at 2 Gy (SF2) (Fig. 2a). No increased sensitivity was seen in either the $Cdk5^{KD}$ cells or the PARP-1^{KD} cells to either MMS or NCS. However, the DNA-$PKcs^{KD}$ cells were extremely sensitive to NCS (Fig. 2b, c). These similarities in cell survival between the $Cdk5^{KD}$ and the Control cells after treatment with MMS or NCS would suggest that the methylated DNA adducts and DSBs generated directly in the DNA after such treatments can be repaired using mechanisms that do not require Cdk5 but would suggest that Cdk5 is involved in the repair of SSBs, a process which involves PARP-1's catalytic activity.

Cdk5 depletion modulates PARP-1 recruitment to sites of localized DNA damage and its enzymatic activity

In order to examine whether the depletion of Cdk5 had an impact on the recruitment of PARP-1, and its partner XRCC1, we made use of the technique of laser microirradiation using a 405-nm laser to generate localized DNA damage in the nucleus of the cells transiently expressing GFP or YFP tagged PARP-1 or XRCC1, respectively. Confocal microscopy was used to follow and quantify the recruitment and persistence of these proteins based on the increase in fluorescence at the site of DNA damage relative to the background fluorescence of the nucleus, reported as the relative spot intensity.

The time-course of the recruitment of GFP-PARP-1 to damage sites seen in the Control cells was extremely rapid, as

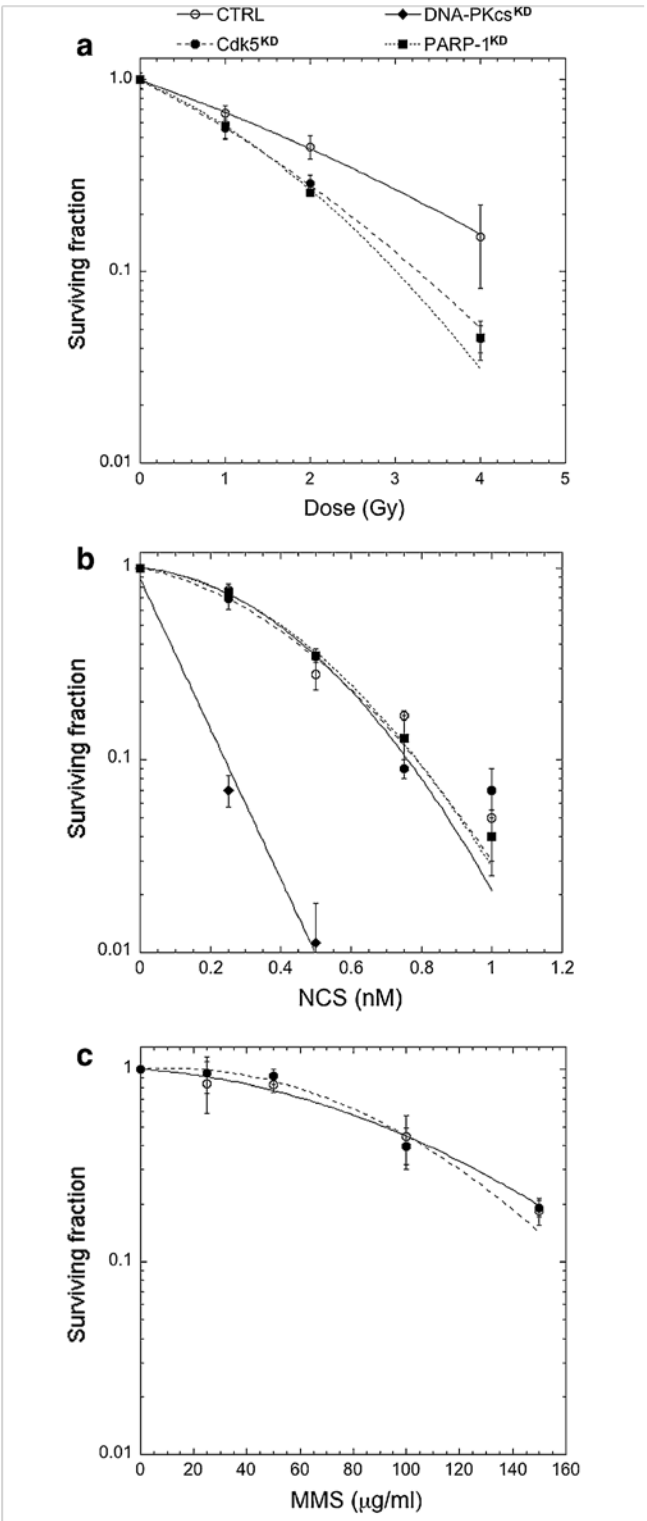


Fig. 2 Clonogenic cell survival to IR, NCS, and MMS of $Cdk5^{KD}$ cells. **a** IR survival in Control, PARP-1, and Cdk5-depleted cells. $\alpha = 0.363 \pm 0.019\ Gy^{-1}$, $\beta = 0.025 \pm 0.007\ Gy^{-2}$ for Control cells; $\alpha = 0.446 \pm 0.042\ Gy^{-1}$, $\beta = 0.105 \pm 0.025\ Gy^{-2}$ for PARP-1^{KD} cells; $\alpha = 0.519 \pm 0.019\ Gy^{-1}$, $\beta = 0.056 \pm 0.011\ Gy^{-2}$ for $Cdk5^{KD}$ cells. **b** Survival to NCS, and **c** MMS. Data represents mean ± SD of 2–4 independent experiments with each dose in triplicate

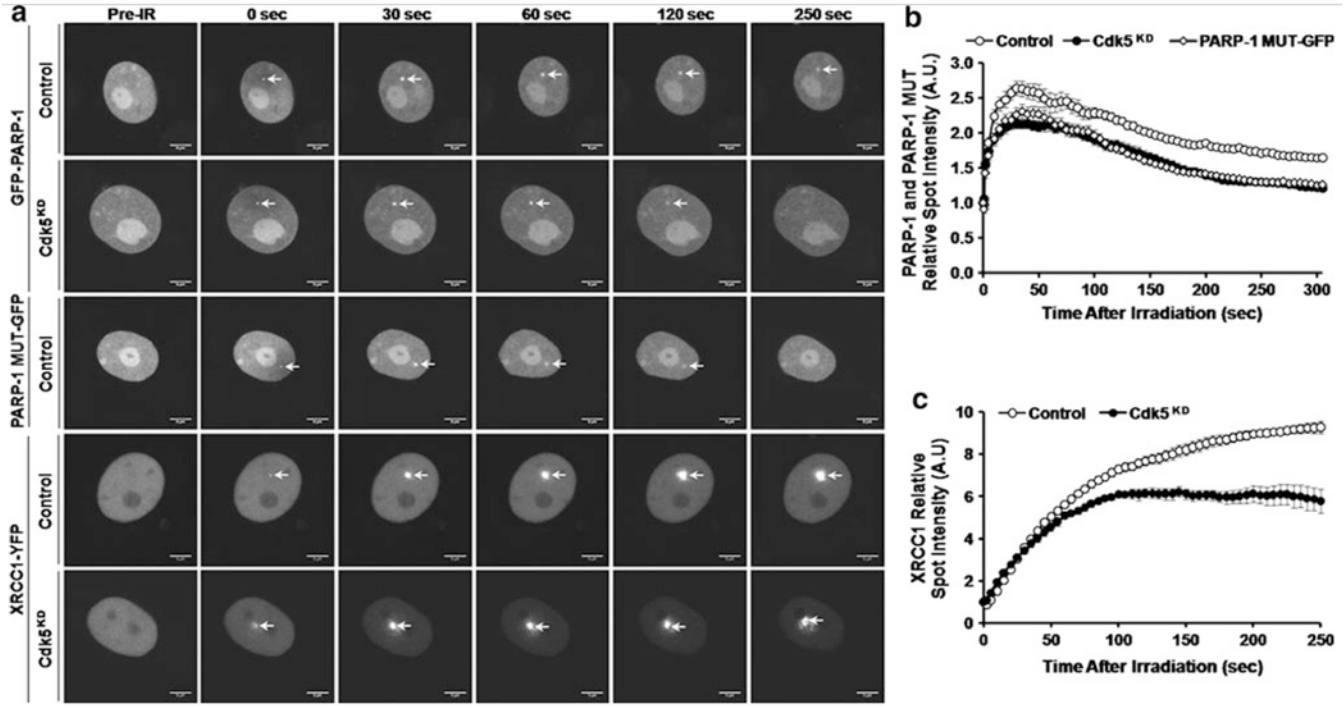


Fig. 3 Recruitment of SSBR proteins in Control and Cdk5^{KD} cells to laser damage sites. **a** Representative images of the recruitment of fluorescent-tagged PARP-1, a serine-mutated PARP-1 (PARP-1 MUT), or XRCC1 to DNA damage sites in Control or Cdk5^{KD} cells. *Scale bar*: 5 μm. **b** Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of GFP-PARP-1 and PARP-1 MUT-GFP recruitment in Control cells and GFP-PARP-1 in Cdk5^{KD} cells and of **c** XRCC1-YFP recruitment in Control and Cdk5^{KD} cells with time. Data represents mean relative spot intensity ± SEM, $n = 7$–12 individual cells from three independent experiments for GFP-PARP-1 and XRCC1-YFP experiments and two independent experiments for PARP-1 MUT-GFP experiments

previously reported [12, 17–20]. However, in the Cdk5^{KD} cells whilst GFP-PARP-1 was detected at damage sites immediately after their formation (Fig. 3a, first and second rows), the quantification of the relative spot intensity with time showed a statistically reduced level ($p < 10^{-3}$) of GFP-PARP-1 at the damage sites in the Cdk5^{KD} cells compared to Control cells from 50 s post-irradiation and which persisted up to 300 s post-irradiation (Fig. 3b). A statistically different ($p < 10^{-3}$) profile of GFP-PARP-1 recruitment was also seen in the Cdk5 depleted clones 1,500 and 1,501 compared to the Control cells (supplementary Fig. 4a and b). As the three serine residues at amino acids 782, 785 and 786 in PARP-1 have been previously reported as in vitro target sites for phosphorylation by Cdk5 [5], we generated a mutant GFP-tagged PARP-1 plasmid in which all three were mutated to alanines (PARP-1 MUT-GFP). Under the same experimental conditions, we found that this mutated form of PARP-1 was also recruited to sites of DNA damage in Control cells immediately following micro-irradiation (0 min), however, its accumulation and persistence was less than that of the control GFP-PARP-1 and showed no statistical difference to the recruitment profile of GFP-PARP-1 in the Cdk5^{KD} cells. (Fig. 3a rows 2 and 3 and 3b). These results would suggest that the phosphorylation of PARP-1 via Cdk5's kinase activity is necessary for its persistence at damage sites.

It has been well-documented that XRCC1 is recruited to local sites of DNA damage in a PAR and PARP-1-dependent fashion [12, 19, 21, 22]. Therefore, in order to verify the consequences of the reduced persistence of PARP-1 at sites of micro-irradiation-induced DNA damage sites in Cdk5^{KD} cells, we next investigated the recruitment of XRCC1-YFP under the same experimental conditions (Fig. 3a). In agreement with other published studies using a similar experimental set-up, a rapid recruitment of XRCC1 was seen in the Control cells [12, 19, 21–23]. However, while we found that the relative intensity of XRCC1-YFP immediately after micro-irradiation (0 min) was not affected by the loss of Cdk5 expression (Fig. 3a rows 4, 5 and 3c), its accumulation was statistically lower ($p < 10^{-4}$) in Cdk5^{KD} cells at time points from 100 s after damage formation as compared to Control cells (Fig. 3c). This result was confirmed in the two additional Cdk5-depleted clones 1,500 and 1,501 (supplementary Fig. 4c and d). Supporting these findings, we observed a similar decreased level and slower accumulation of fluorescence from the YFP-tagged XRCC1 in Control cells exposed to the Cdk5 inhibitor roscovitine (supplementary Fig. 1).

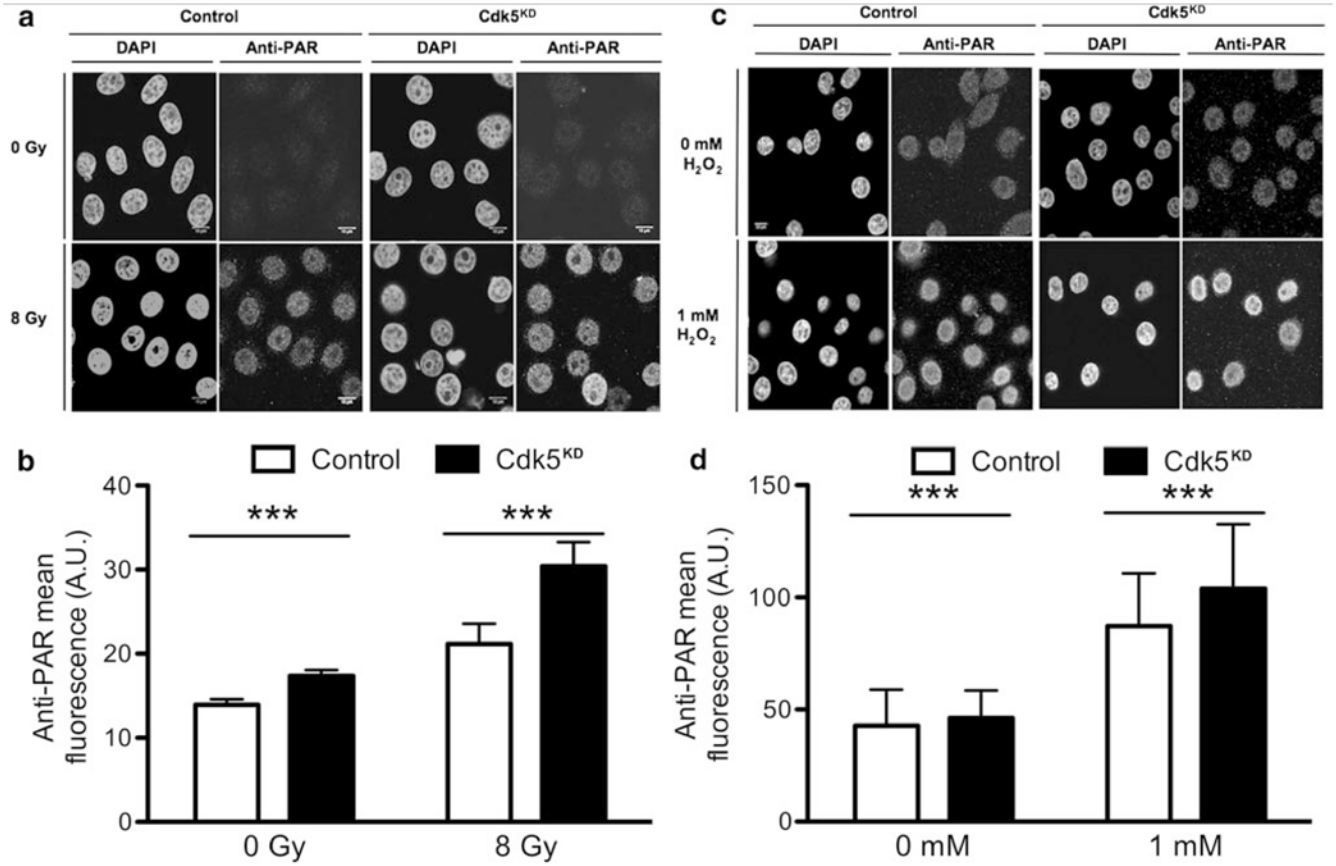


Fig. 4 Quantification of poly(ADP-ribose) (PAR) formation. Representative images of PAR immunofluorescence in Control cells or $Cdk5^{KD}$ cells before and after exposure to 8 Gy of ionizing radiation (**a**, zooming set to 4) or after treatment with 1 mM H_2O_2 (**c**, zooming set to 3). *Scale bar*: 10 μM. **b**, **d** Quantification of the PAR staining. Data represents the mean ± SD *** ($p < 10^{-4}$) based on the fluorescence intensity in over 300 cells/treatment group in 2–4 independent experiments

The persistence of PARP-1 at sites of SSBs is regulated by the PAR chains formed during the automodification of the PARP-1 protein itself. These PAR chains impart a negative charge on PARP-1 and result in its eventual dissociation from the DNA as a consequence of charge repulsion between the negative charge of the DNA and the PAR chains [1, 22]. In order to investigate whether the reason for the reduced accumulation of PARP-1 observed in the $Cdk5^{KD}$ cells could be related to differences in the levels of PAR formed in the two cell types, we measured the basal levels and the levels formed in response to DNA damage induced by IR or H_20_2 using immunofluorescence making use of a specific anti-PAR antibody.

A statistically higher basal level of PAR was detected in the $Cdk5^{KD}$ cells and also in the clones 1,500 and 1,501 compared to the Control cells (Fig. 4b, d and supplementary Fig. 4e). After exposure to IR, the PAR levels were increased in both cell types with significantly higher absolute levels being found in the $Cdk5^{KD}$ compared to the Control cells ($p < 10^{-4}$, $n = 300$–500 cells) (Fig. 4a, b). A similar response was seen after exposure to 1 mM H_2O_2 ($p < 10^{-5}$, $n = 400$–800 cells) (Fig. 4c, d). Confirmatory data obtained from clones 1,500 and 1,501 showing significantly higher absolute PAR levels compared to Control cells after treatment with IR is shown in supplementary Fig. 4e ($p < 10^{-5}$, $n = 200$–300 cells).

These observations of higher levels of PAR formation were validated by measuring the changes in NAD(P)H levels using a colorimetric assay [13]. However, due to the technical limitations associated with the assay, this could only be done after the H_2O_2 treatment, where the exposure could be carried out over a longer period of time. While the $PARP\text{-}1^{KD}$ cells showed a negligible decrease in NAD(P)H levels under these experimental conditions, the $Cdk5^{KD}$ cells showed a significantly greater consumption of NAD(P)H compared to the Control cells ($p < 10^{-4}$), indicative of a higher PARP activity after DNA damage induced by H_2O_2 (supplementary Fig. 2).

A possible explanation for the finding of higher polymer formation in $Cdk5^{KD}$ cells is that the activity of poly(ADP-ribosyl) glycohydrolase (PARG), responsible for removing the PAR polymers from PARP-1 [24], is reduced in the absence of Cdk5. Post-translational modifications of PARG have been reported at a number of positions, several of which

are located in the N-terminal putative regulatory region raising the possibility that as for PARP-1, phosphorylation events may modulate PARG activity [5, 25, 26]. This N-terminal region contains a sequence around Ser 137 that shows a high degree of homology with the consensus sequence for Cdk5 phosphorylation (KS/TPXK) [27]. However, no differences were seen between the Cdk5^{KD} and Control cells in either their PARG mRNA or protein levels (data not shown), nor in either the basal PARG activity or after exposure of the cells to IR (supplementary Fig. 3). Based on these results and the recruitment data, we hypothesize that the phosphorylation of the PARP-1 protein by Cdk5 on one or more of the serines 782, 785, and 786 results in an attenuation of its ribosylating activity facilitating its persistence at the sites of DNA damage.

Cells lacking Cdk5 are able to effectively repair DNA single-strand breaks (SSB)

In order to investigate whether the impaired recruitment of PARP-1 and XRCC1 in the Cdk5^{KD} cells had an impact on SSB rejoining, the kinetics was compared in unsynchronized Control and Cdk5^{KD} cells after exposure to gamma irradiation (5 Gy) using alkaline elution. Immediately following irradiation, as little as 5% of the total [2-^{14}C] thymidine-labeled DNA from lysed Control and Cdk5^{KD} cells was retained on the filters and in a time-dependent manner over 1 h, the SSB repair proceeds to completion with nearly 100% of the DNA retained on the filter, indicating complete SSB rejoining, by this time point in both cell lines (Fig. 5).

DNA SSB repair can also proceed through the alternative long patch (LP) BER sub-pathway involving the binding of PCNA to sites of DNA damage. In order to investigate whether this mechanism could contribute to the repair of SSBs in the Cdk5^{KD} cells, GFP-tagged PCNA was transiently transfected into these and Control cells, and its recruitment to

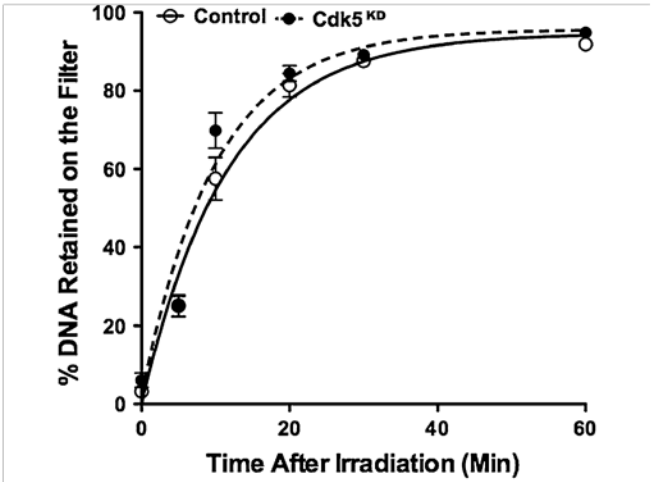


Fig. 5 Alkaline elution analysis of the kinetics of SSB rejoining in Control and Cdk5^{KD} cells. The *curves* were drawn to an exponential equation (see "Materials and methods") for best fit to experimental data $\alpha = 0.109 \pm 0.050$ min^{-1} ($t_{1/2} = 6.36$ min), $R_\infty = 95.35\%$ (Control); $\alpha = 0.087 \pm 0.050$ min^{-1} ($t_{1/2} = 8.01$ min), $R_\infty = 96.89\%$ (Cdk5^{KD}). Data represents mean and SD for two independent experiments. Where error bars are missing, they were smaller than the size of the symbols

DNA-damage sites produced by laser micro-irradiation were assessed as previously described [12, 18, 20, 21]. In the Control cells, the fluorescence intensity of PCNA at the irradiated site was significantly lower than for XRCC1, which is in good agreement with earlier studies [12, 18, 23], and increased slowly over the observation period. However, in the Cdk5^{KD} cells, the amount and rate of PCNA-GFP accumulation was significantly higher (Fig. 6).

These results suggest that the SSBs generated might also be repaired via a PCNA-dependent pathway compensating for the deficiencies in the recruitment of the PARP-1 and XRCC1 in the Cdk5^{KD} cells. Thus, although the loss of Cdk5 does not prevent cells from resolving SSBs, it does have an impact on PARP-1 activity and radiation sensitivity.

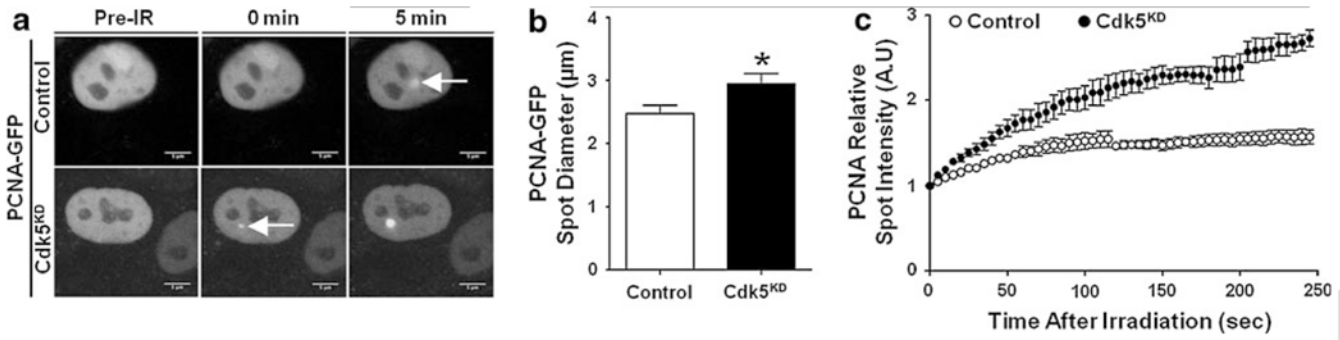


Fig. 6 Analysis of GFP-tagged PCNA recruitment to laser damage sites in Control or Cdk5^{KD} cells. **a** Representative images of Control and Cdk5^{KD} cells expressing PCNA-GFP before irradiation (Pre-IR), immediately following irradiation (0 min) and after 5 min. *Scale bar* (*lower right*) is 5 μm. **b** Quantification of spot diameter of PCNA-GFP at sites of micro-irradiation in Control and Cdk5^{KD} at 5 min. Data represents mean ± SEM, $n = 9$–10 individual cells from two independent experiments, $^*p < 0.05$. **c** To quantify the kinetics of recruitment of these proteins to DNA damage sites, images were collected over a time course from 0 to 250 s every 5 s. Data represents the mean ± SEM, $n = 9$–10 individual cells from one representative experiment

Discussion

While deficiencies in DNA repair processes are associated with cancer susceptibility and tumor resistance to different DNA-damaging cancer therapies, the inhibition of DNA repair by small-molecule inhibitors can potentially be exploited to sensitize tumor cells in certain genetic backgrounds or when used in combination with chemo and radiotherapy. PARP-1 is one such target and based on the compelling evidence that defects in DSB repair in breast cancer, particularly in *BRCA1* and *BRCA2* backgrounds, sensitize cells to PARP inhibitors, clinical trials are now currently being conducted with PARP inhibitors in various cancer types (see [28] for recent review). Since these landmark studies, there has been a focus on identifying additional indirect therapeutic targets that modulate PARP activity and could also increase the efficacy of combination cancer therapies. Cdk5 was identified as such a candidate given that its silencing confers significant sensitization to PARP inhibitors [6] and its potential role in DNA repair mechanisms [29, 30]. Here, we confirm that cells with depleted Cdk5 expression are highly sensitive to PARP inhibition and present data that in three independent clones in which different regions of the Cdk5 mRNA were targeted, the subsequent depletion of Cdk5 protein levels alters PARP-1's recruitment and persistence at sites of DNA damage and PAR formation is increased after exposure to DNA-damaging agents. These results taken together with the finding that the recruitment profile of GFP-tagged PARP-1 in which the serines 782, 785, and 786, reported to be Cdk5 phosphorylation targets in vitro [5], are replaced with alanine residues to the sites of DNA damage in Control cells is the same as that of GFP-tagged PARP-1 in the $Cdk5^{KD}$ cells, would suggest that Cdk5 might modify the PARP-1 protein. The altered recruitment could formally be a consequence of a conformational change brought about by the substitution of the serines at these positions by alanines. However, we do not believe this to be likely based on an analysis of PARP-1 structures available in public databases that show that these residues are located within a flexible and highly accessible external loop of the PARP-1 protein (Saettel and Pennaneach, unpublished data). Based on all our experimental data and this consideration, it would appear that the post-translational modification of PARP-1 by Cdk5 is necessary for its maximal recruitment to DNA-damage sites and thus for normal PARP-1 function in SSBR and as a consequence, also the recruitment and persistence of XRCC1 at damage sites.

The regulation of PARP-1 activity by phosphorylation has been described in vitro and in vivo. For instance, Aoufouchi and Shall [31] demonstrated that during the maturation of *Xenopus laevis* oocytes to unfertilized eggs, PARP-1 is phosphorylated, which switches on its enzymatic activity, while its phosphorylation by protein kinase C in vitro was found to inhibit PARP activity and its binding capacity [32, 33]. Additionally, it has been found in vitro that the dephosphorylation of recombinant human PARP-1 with calf–intestinal alkaline phosphatase reduces its enzymatic activity by about 75% [34]. The post-translational modification of PARP-1 is clearly a complex process impacting on its activity. Several potential phosphorylation sites within the PARP-1 protein have been identified using bioinformatic approaches and mass spectrometry analysis that implicate multiple kinases, some capable of phosphorylating several residues within the protein. Phosphorylation of some of these sites has been confirmed in vitro using kinases such as PKCβ, ERK1/2, JNK1, CamK-II, and CKII, in addition to Cdk5 [5, 33–36]. The impact of phosphorylation at specific sites on PARP-1 function has not, however, been extensively studied. Gagne et al. [5] analyzed the recruitment kinetics of GFP-tagged phospho-mutants within the first N-terminal zinc finger domain of PARP-1 that is required for DNA binding. They found that a glutamate substituted Ser 41, which mimics a permanently phosphorylated protein, impaired both the recruitment and the subsequent persistence of PARP-1 at laser micro-irradiation-induced damage sites while similar substitutions to mimic phosphorylated residues at Ser 27 and 32 had little effect. This result is in contrast to our findings where the absence of Cdk5 or mutating the serines 782, 785, and 786 within PARP-1 that have been shown to be phosphorylated in vitro by Cdk5 [5] are associated with increased intra-cellular polymer levels and lower recruitment of PARP-1 to DNA-damage sites. As discussed above, this altered PARP-1 profile under these experimental conditions could be explained by either an increased catalytic activity of PARP-1 in the absence of Cdk5, which would result in an excessive automodification of PARP-1, itself a major target of the polymers formed, or thus its dissociation from the DNA through charge repulsion or alternatively a decreased PARG activity. Our experimental results support the first option, as no differences in PARG activity were found between $Cdk5^{KD}$ and Control cells.

One phenotype of the $Cdk5^{KD}$ cells that remains to be fully explained is their sensitivity to the killing effects of IR. Whether this observation is just a consequence of the altered PARP-1 activity, which would result in a perturbation of polyADP ribosylation in the $Cdk5^{KD}$ cells, or is due to the involvement of Cdk5 in other DNA repair and/or other pathways such as cell cycle control, through post-translational modifications or transcriptional control, needs to be established. The role of Cdk5 in cell-cycle control has been extensively studied in the context of neuronal cells where Cdk5 is associated with a fatal re-entry of

post-mitotic cells into the cell cycle [7, 37–39], and as discussed above, Turner et al. [6] showed a defect in intra-S and G2/M checkpoints following treatment with 10 Gy of IR in proliferating Cdk5-deficient cells. In addition, Cdk5 has been shown to phosphorylate the STAT3 protein following DNA damage induced by the inhibition of topoisomerase I [40, 41] and other reports have shown that Cdk5 can directly phosphorylate key players in BER and DSB repair, such as Ape1 or ATM and alter their activity [29, 30]. Based on our data, it is tempting to speculate that the increased radiation sensitivity is not due to the lack of repair of SSBs per se, as under the experimental conditions used, a complete religation of the SSBs generated after exposure to IR is seen in these cells with a kinetic profile that resembles that seen in Control cells. This may involve a PCNA-dependent sub-pathway compensating for the altered recruitment of PARP-1 and XRCC1 in the $Cdk5^{KD}$ cells. However, there is no experimental evidence that would suggest that a switch between SP and LP BER sub-pathways is related to increased radiation sensitivity. The observations that no differences were observed in the cell survival between the $Cdk5^{KD}$ and Control cells after treatment with NCS, an agent that directly produces DNA DSBs, would suggest that the detection and repair of DSBs is not associated either with the increased radiation sensitivity but would support the hypothesis that the handling of SSBs, perhaps at the replication fork, and the activation of the necessary cell-cycle checkpoints, underlies this radiation sensitivity. It is interesting to note that Turner et al. [6] reported that their Cdk5-depleted cells were sensitive to the cell-killing effects of camptothecin, which blocks topoisomerase 1 and whose toxicity is linked to the conversion of SSBs to DSBs when the replication fork collides with complexes formed by DNA and camptothecin [42]. An alternative possibility could be a more indirect effect of the Cdk5 depletion and one linked to the modification of PARP activity in the Cdk5-depleted cells. In addition to its role in SSB repair, in response to DNA damage, PARP-1 poly (ADP-ribosyl)ates the histones situated around the site of the damage, facilitating the relaxation of the chromatin (for a review see [43]). The higher levels of PAR seen in the Cdk5-depleted clones both before and after exposure to IR, and also H_20_2, could cause excessive or prolonged chromatin relaxation providing an additional, potentially additive mechanism of radiation-induced cell death in these cells.

In conclusion, several studies have now demonstrated a role for Cdk5 in cell metabolism in non-neuronal cell types and more specifically that Cdk5 can directly modify proteins integral in the DNA damage/DNA repair response pathways. A depletion in the level of Cdk5 results in an increased level of PAR polymer formation and an altered profile of PARP-1 recruitment at damaged sites but not an overall deficit in SSB repair. Turner et al. [6] reported a genomic loss of *CDK5* in 5.5% of breast cancers and taken together with our results suggest that *CDK5* gene might represent a potential biomarker for a specific sub-population of breast cancer patients that would benefit from combined PARP-1 inhibitor and radiation treatment. Additionally, modification of the Cdk5 activity in tumor cells could be a novel therapeutic target in conjunction with this combination treatment.

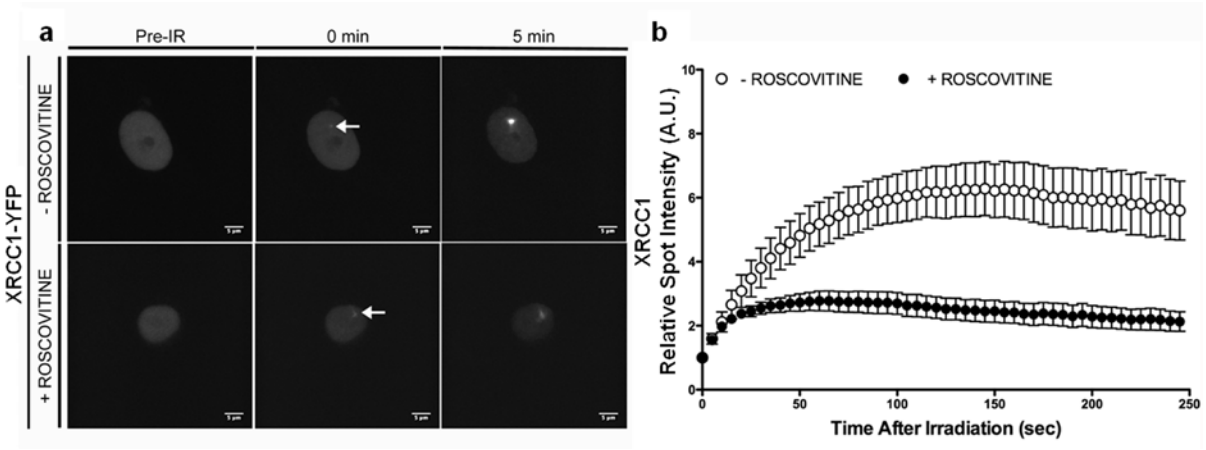
Acknowledgments We wish to thank Camille Godon, Celia Rosilio, and Yun-Han Huang who participated in early stages of this project, Amélie Croset who shared PAR protocols with us, and Nicolas Saettel for helpful discussions on PARP structures. The financial support of Electricité de France, INSERM, and Institut Curie are gratefully acknowledged. Celeste Bolin and Tomasz Zaremba were supported by Institute Curie's International Postdoctoral fellow program and Tomasz Zaremba was also supported by a fellowship from the Fondation Pierre-Gilles de Gennes.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

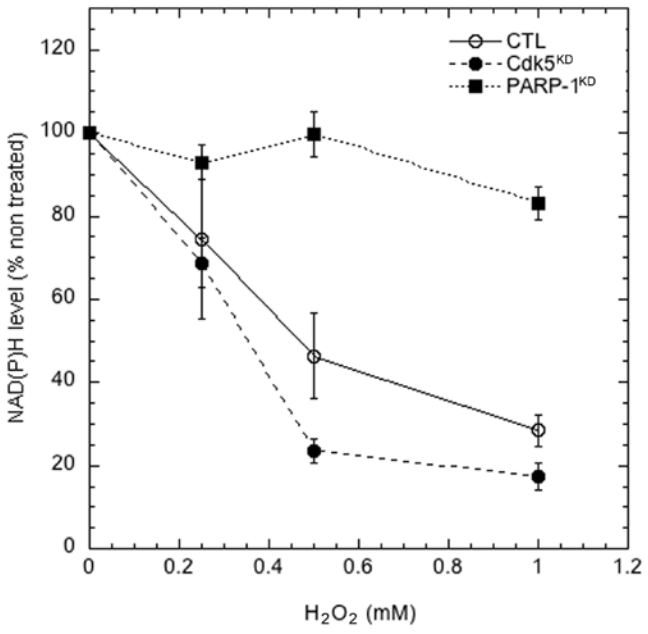
References

1. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. Nat Rev Mol Cell Biol 7(7):517–528
2. Noel G, Godon C, Fernet M, Giocanti N, Megnin-Chanet F, Favaudon V (2006) Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1, 8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis. Mol Cancer Ther 5(3):564–574
3. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. Nature 434(7035):913–917
4. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. Nature 434(7035):917–921
5. Gagne JP, Moreel X, Gagne P, Labelle Y, Droit A, Chevalier-Pare M, Bourassa S, McDonald D, Hendzel MJ, Prigent C, Poirier GG (2009) Proteomic investigation of phosphorylation sites in poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase. J Proteome Res 8(2):1014–1029
6. Turner NC, Lord CJ, Iorns E, Brough R, Swift S, Elliott R, Rayter S, Tutt AN, Ashworth A (2008) A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. EMBO J 27(9):1368–1377
7. Cicero S, Herrup K (2005) Cyclin-dependent kinase 5 is essential for neuronal cell cycle arrest and differentiation. J Neurosci 25(42):9658–9668
8. Penning TD, Zhu GD, Gandhi VB, Gong J, Liu X, Shi Y, Klinghofer V, Johnson EF, Donawho CK, Frost DJ, Bontcheva-Diaz V, Bouska JJ, Osterling DJ, Olson AM, Marsh KC, Luo Y,

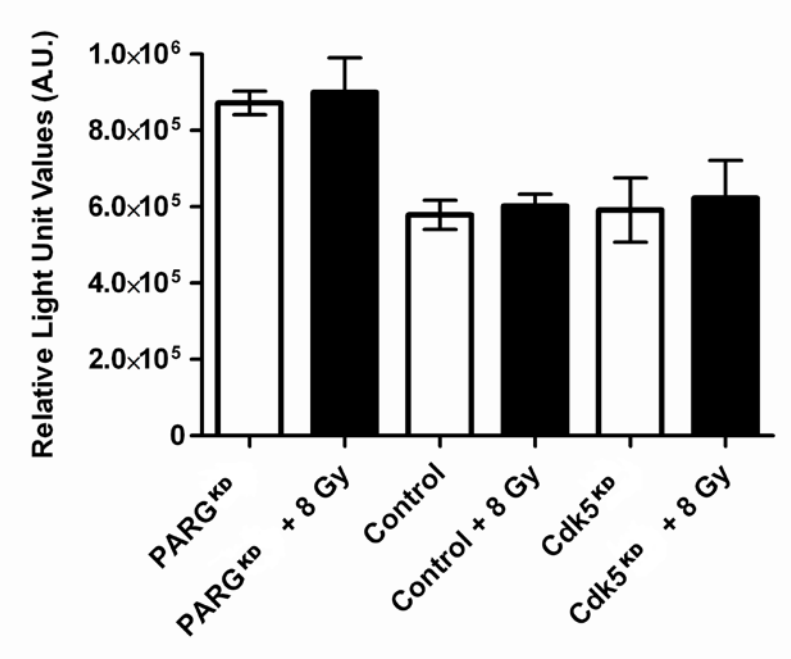
Giranda VL (2009) Discovery of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 2-[(R)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer. J Med Chem 52(2):514–523
9. Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, Vandenbrouck Y (2006) An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. BMC Bioinformatics 7:520
10. Biard DS, Despras E, Sarasin A, Angulo JF (2005) Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing. Mol Cancer Res 3(9):519–529
11. Despras E, Pfeiffer P, Salles B, Calsou P, Kuhfittig-Kulle S, Angulo JF, Biard DS (2007) Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. Cancer Res 67(6):2526–2534
12. Godon C, Cordelieres FP, Biard D, Giocanti N, Megnin-Chanet F, Hall J, Favaudon V (2008) PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. Nucleic Acids Res 36(13): 4454–4464
13. Nakamura J, Asakura S, Hester SD, de Murcia G, Caldecott KW, Swenberg JA (2003) Quantitation of intracellular NAD(P)H can monitor an imbalance of DNA single strand break repair in base excision repair deficient cells in real time. Nucleic Acids Res 31(17):e104
14. Filipski J, Kohn KW (1982) Ellipticine-induced protein-associated DNA breaks in isolated L1210 nuclei. Biochim Biophys Acta 698(3):280–286
15. Beranek DT, Weis CC, Swenson DH (1980) A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. Carcinogenesis 1(7):595–606
16. Dedon PC, Jiang ZW, Goldberg IH (1992) Neocarzinostatin-mediated DNA damage in a model AGT. ACT site: mechanistic studies of thiol-sensitive partitioning of C4′ DNA damage products. Biochemistry 31(7):1917–1927
17. Gagne JP, Isabelle M, Lo KS, Bourassa S, Hendzel MJ, Dawson VL, Dawson TM, Poirier GG (2008) Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. Nucleic Acids Res 36(22): 6959–6976
18. Lan L, Nakajima S, Oohata Y, Takao M, Okano S, Masutani M, Wilson SH, Yasui A (2004) In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 101(38):13738–13743
19. Mortusewicz O, Ame JC, Schreiber V, Leonhardt H (2007) Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. Nucleic Acids Res 35(22):7665–7675
20. Mortusewicz O, Fouquerel E, Ame JC, Leonhardt H, Schreiber V (2011) PARG is recruited to DNA damage sites through poly(-ADP-ribose)- and PCNA-dependent mechanisms. Nucleic Acids Res [Epub ahead of print]
21. Okano S, Lan L, Caldecott KW, Mori T, Yasui A (2003) Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. Mol Cell Biol 23(11):3974–3981
22. Quenet D, El Ramy R, Schreiber V, Dantzer F (2009) The role of poly(ADP-ribosyl)ation in epigenetic events. Int J Biochem Cell Biol 41(1):60–65
23. Mortusewicz O, Leonhardt H (2007) XRCC1 and PCNA are loading platforms with distinct kinetic properties and different capacities to respond to multiple DNA lesions. BMC Mol Biol 8:81
24. Ame JC, Fouquerel E, Gauthier LR, Biard D, Boussin FD, Dantzer F, de Murcia G, Schreiber V (2009) Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells. J Cell Sci 122(12):1990–2002
25. Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP (2004) Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 101(33):12130–12135
26. Villen J, Beausoleil SA, Gerber SA, Gygi SP (2007) Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. Proc Natl Acad Sci USA 104(5):1488–1493
27. Lalioti V, Pulido D, Sandoval IV (2010) Cdk5, the multifunctional surveyor. Cell Cycle 9(2):284–311
28. Annunziata CM, O'Shaughnessy J (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase as a novel therapeutic target in cancer. Clin Cancer Res 16(18):4517–4526
29. Huang E, Qu DAB, Zhang Y, Venderova K, Haque ME, Rousseaux MWC, Slack RS, Woulfe JM, Park DS (2010) The role of Cdk5-mediated apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 phosphorylation in neuronal death. Nat Cell Biol 12(6):563–571
30. Tian B, Yang Q, Mao Z (2009) Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death. Nat Cell Biol 11(2):211–218
31. Aoufouchi S, Shall S (1997) Regulation by phosphorylation of Xenopus laevis poly(ADP-ribose) polymerase enzyme activity during oocyte maturation. Biochem J 325(Pt 2):543–551
32. Bauer PI, Farkas G, Buday L, Mikala G, Meszaros G, Kun E, Farago A (1992) Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly ADP-ribose polymerase protein catalysed by protein kinase C. Biochem Biophys Res Commun 187(2): 730–736
33. Tanaka Y, Koide SS, Yoshihara K, Kamiya T (1987) Poly(ADP-ribose) synthetase is phosphorylated by protein kinase C in vitro. Biochem Biophys Res Commun 148(2):709–717
34. Kauppinen TM, Chin WY, Suh SW, Wiggins AK, Huang EJ, Swanson RA (2006) Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. Proc Natl Acad Sci USA 103(18):7136–7141
35. Ullrich O, Diestel A, Eyupoglu IY, Nitsch R (2001) Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. Nat Cell Biol 3(12):1035–1042
36. Walker JW, Jijon HB, Madsen KL (2006) AMP-activated protein kinase is a positive regulator of poly(ADP-ribose) polymerase. Biochem Biophys Res Commun 342(1):336–341
37. Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K (2001) DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. J Neurosci 21(8):2661–2668
38. Yang Y, Mufson EJ, Herrup K (2003) Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. J Neurosci 23(7):2557–2563
39. Zhang J, Cicero SA, Wang L, Romito-Digiacomo RR, Yang Y, Herrup K (2008) Nuclear localization of Cdk5 is a key determinant in the postmitotic state of neurons. Proc Natl Acad Sci USA 105(25):8772–8777
40. Fu AK, Fu WY, Ng AK, Chien WW, Ng YP, Wang JH, Ip NY (2004) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. Proc Natl Acad Sci USA 101(17): 6728–6733
41. Mullaart E, Boerrigter ME, Ravid R, Swaab DF, Vijg J (1990) Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients. Neurobiol Aging 11(3):169–173
42. Pommier Y, Redon C, Rao VA, Seiler JA, Sordet O, Takemura H, Antony S, Meng L, Liao Z, Kohlhagen G, Zhang H, Kohn KW (2003) Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. Mutat Res 532(1–2):173–203
43. Rouleau M, Aubin RA, Poirier GG (2004) Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. J Cell Sci 117(Pt 6):815–825



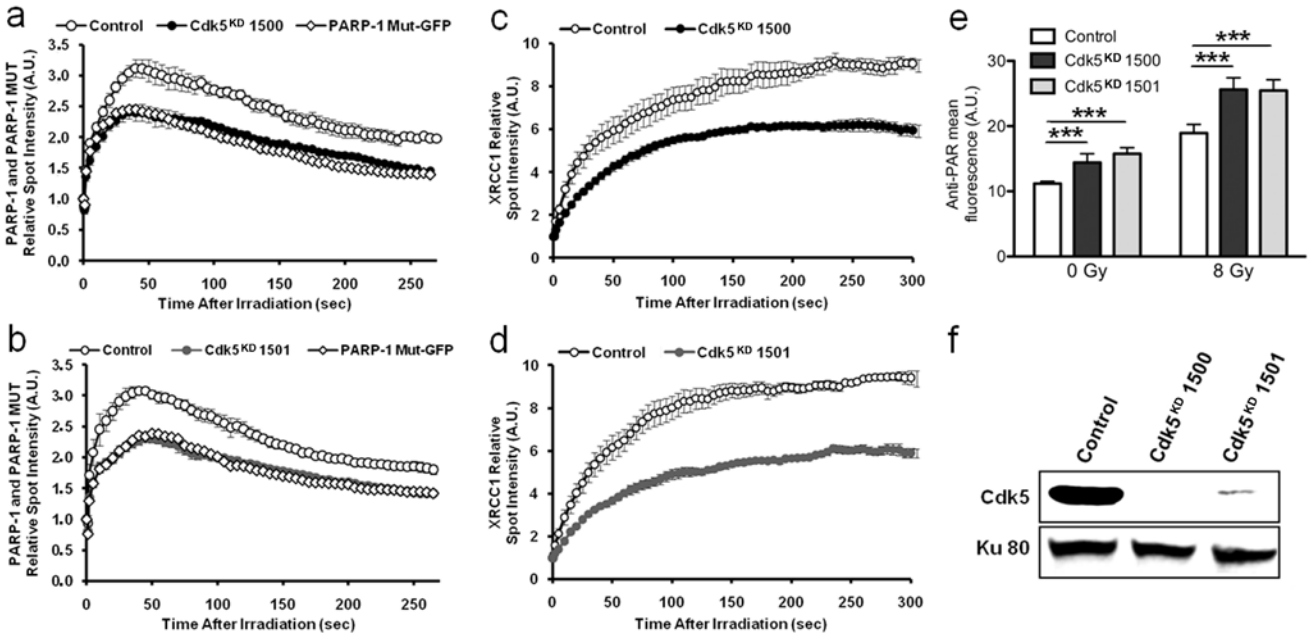
Supplemental Fig. 1 : XRCC1-YFP recruitment at sites of micro-irradiation in Control cells. (a) Representative images of the recruitment of XRCC1-YFP in Control cells treated with or without 10 μM of the Cdk5 inhibitor roscovitine for 24 h prior to micro-irradiation. (b) Quantification of the recruitment of XRCC1-YFP over a time course from 0 to 250 s. Scale bar (lower right) is 5 μm. Data represents mean and SEM, *n=3-10* individual cells from two independent experiments.



Supplemental Fig. 2 : NAD(P)H levels in Control and Cdk5 KD cells after treatment with a range of H_2O_2 concentrations, expressed as average percentages of non-treated levels. Error bars represent the SD of three independent experiments, ***$P<10^{-4}$.



Supplemental Fig. 3 : Effects of Cdk-5 depletion and irradiation (8 Gy) on PARG activity in cells. No significant alteration of mean PARG activity was observed in Cdk5 KD cells (*P*=0.74) or irradiated Cdk5 KD cells (*P*=0.63) compared with controls and irradiated controls, respectively. Relative Light Unit Values correspond to the amount of PAR polymer which has not been hydrolysed during a 30 min incubation with a protein extract prepared from untreated or treated cells incubation time. Data are mean ± SD of 6 replicates for each sample.



Supplemental Fig. 4 : The phenotype of Cdk5 depleted clones 1500 and 1501. Quantification of the relative spot intensity with time of fluorescent tagged PARP-1 in Control or the Cdk5 depleted clone 1500 (a) or clone 1501 (b) and the serine-mutated tagged PARP-1 (PARP-1 MUT) in control cells. Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of XRCC1-YFP recruitment in Control and the Cdk5 depleted clone 1500 (c) or clone 1501 (d) with time. Data represents mean relative spot intensity ± SEM, *n= 6-9* individual cells from one experiment for each condition. Quantification of poly(ADP-ribose) (PAR) PAR staining in the untreated Cdk5 depleted clones 1500 and 1501 and Control cells and after exposure to 8 Gy IR. Data represents the mean ± SD *** ($P<10^{-4}$) based on the fluorescence intensity in 200- 350 cells/treatment group in one experiment. Western Blot analysis confirming stable depletion of Cdk5 expression in clones 1500 and 1501 (f).

III. Discussion - Conclusions

Les études visant l'amélioration de la thérapie des cancers montrent que les processus de réparation d'ADN sont associés à la sensibilité des cellules cancéreuses et à la résistance des tumeurs à différentes thérapies dépendantes de l'induction des dommages de l'ADN. L'inhibition de la réparation d'ADN, par des petites molécules inhibitrices ciblant des protéines de réparation, peut potentiellement être exploitée pour sensibiliser des cellules tumorales dans certains contextes génétiques ou quand elle est utilisée en association avec la chimio- et la radiothérapie. PARP-1 est l'une des cibles potentielles pour la sensibilisation des cellules tumorales sous certaines conditions. En effet, les défauts de réparation des CDB dans le cancer du sein, particulièrement dans le contexte de *BRCA1*$^{-/-}$ *ou BRCA2*$^{-/-}$, sensibilisent les cellules aux inhibiteurs de PARP (15). Les essais cliniques sont actuellement conduits avec des inhibiteurs de PARPs dans différents types de cancer (Introduction générale § IV.1.2.2). Actuellement il y a une focalisation sur l'identification des cibles thérapeutiques indirectes supplémentaires qui modulent l'activité PARP et qui pourraient augmenter l'efficacité des thérapies combinées des cancers. Cdk5 a été identifié comme une telle cible dont l'inhibition par des siRNA provoque une forte sensibilité aux inhibiteurs de PARP.

La modification d'activité de PARP-1 par phosphorylation a été décrite *in vitro* et *in vivo* (Introduction générale § IV.2.1) et plusieurs sites de phosphorylation dans PARP-1 ont été caractérisés. Les serines 782, 785 et 786 de PARP-1 ont été identifiées *in vitro*, comme étant phosphorylées par la kinase Cdk5 (168), ce qui fait de cette kinase une cible potentielle dans la modulation de l'activité PARP. Cependant, ni l'impact de la phosphorylation de PARP-1 sur ces trois sérines par Cdk5, ni le(s) mécanisme(s) à l'origine de la létalité synthétique observée en présence d'inhibiteurs de PARP dans les cellules dépourvues de Cdk5 ne sont connus.

Dans cette première partie, nous avons montré pour la première fois que la modification post traductionnelle de ces trois sérines de PARP-1 par phosphorylation par Cdk5 est nécessaire pour son recrutement maximal au site du dommage. En effet la déplétion de Cdk5 augmente l'activité de PARP-1 et donc le niveau des PARs liés à PARP-1 elle-même ce qui entraîne un nombre élevé de charges négatives autour de PARP-1 facilitant sa dissociation et limitant son recrutement à l'ADN (figure 22).

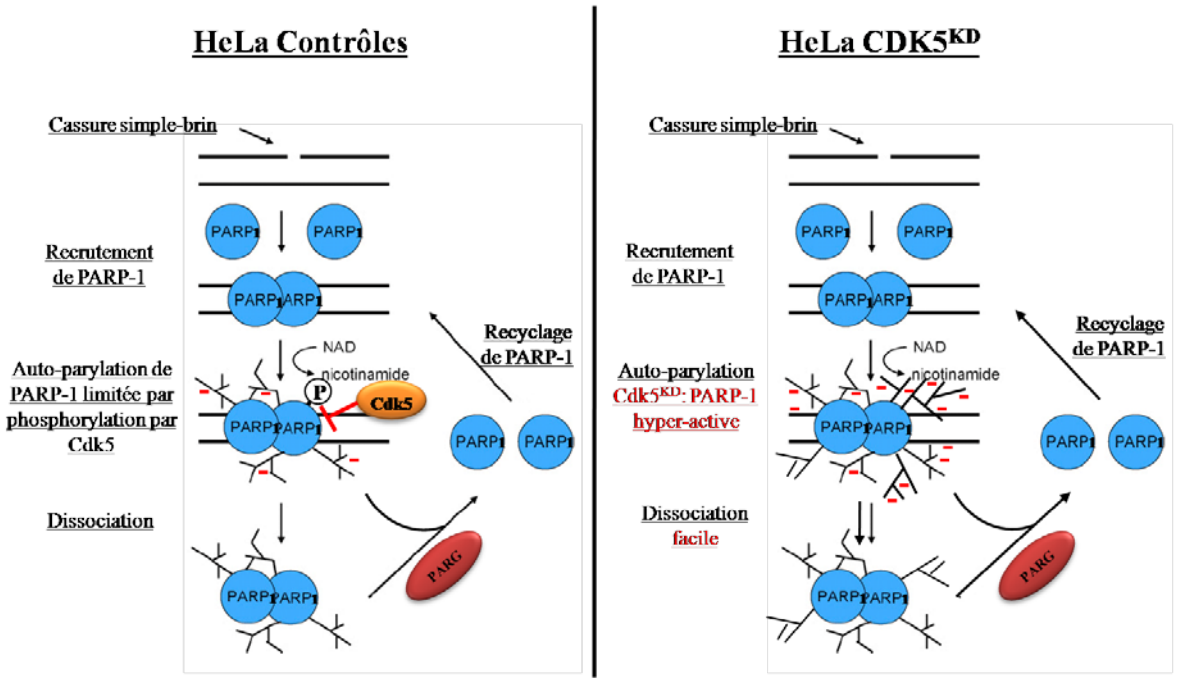


Figure 22 : Scémas représentatifs de régulation de recrutement et de dissociation de PARP-1 du site d'une cassure simple-brin, dans des cellules HeLa, en présence (à gauche) ou en absence (à droite) de Cdk5.

La déplétion de Cdk5 affecte également le recrutement de XRCC1. Etant donné que le recrutement de XRCC1 au site du photo-dommage est majoritairement dépendant de PARP-1, la diminution du recrutement de XRCC1 est fort probablement due à la diminution du recrutement de PARP-1. Cependant nous n'excluons pas la possibilité que Cdk5 puisse affecter le recrutement de XRCC1 indépendamment de PARP-1 et peut être par phosphorylation. Il a été montré que XRCC1 contient des sites de phosphorylation (480), cependant il est incunnu si elle est phosphorylable par Cdk5.

Parallèlement, nous avons observé une hyper-radiosensibilité des cellules Cdk5^{KD}. Ces résultats sont à rapprocher de ceux publiés par Turner et al. (508) qui ont montré une hyper-sensibilité des cellules déplétées en Cdk5 en présence de camptothécine. La camptothécine bloque la Topoisomérase 1 formant des CSBs qui génèrent après passage des fourches de réplication des CDBs létales (413). L'ensemble de ces données suggère un dysfonctionnement dans le SSBR des cellules Cdk5^{KD}. Cependant nos travaux sur les cinétiques de religation des CSBs après déplétion de Cdk5 et induction de dommages montrent que le SSBR est intact. L'augmentation du niveau de PCNA recruté au site du dommage suggère une fonctionnalité du SSBR via une compensation du SPR inactif par un LPR plus actif (figure 23).

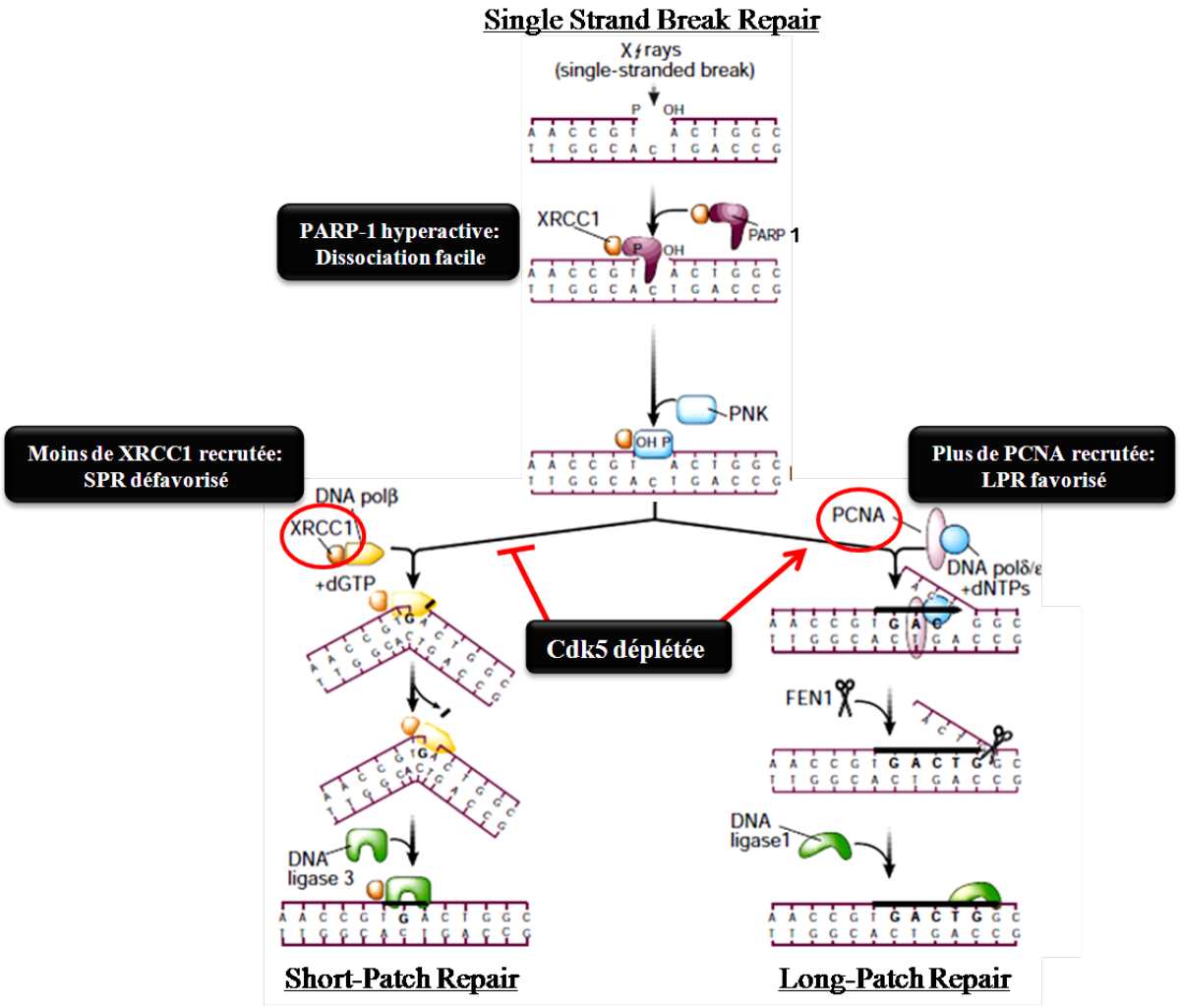


Figure 23 : Les effets de la déplétion de Cdk5 sur l'activité de PARP-1 et le recrutement de PARP-1, XRCC1 et PCNA au niveau d'une cassure simple-brin, et leurs conséquences sur le SSBR. (Modifiée de Hoeijmakers, Nature, 2001).

Il est connu que PARP-1 poly(ADP-ribos)yle les histones en réponse aux dommage de l'ADN ce qui facilite la relaxation de la chromatine et l'accès aux protéines de la réparation (Introduction générale § IV.1.4). Le niveau élevé des PARs dans les cellules Cdk5^{KD} avant et après irradiation est donc un avantage pour une relaxation excessive ou prolongée de la structure chromatinienne ce qui pourrait rendre explication à l'hyper-radiosensibilité de ces cellules.

Ensemble, les données rapportées par Turner et al. montrant une perte génomique de *CDK5* dans 5.5% des cancers de sein et nos présents résultats suggèrent que le gène *CDK5* peut être un bio-marqueur d'une sous population de patients atteints par des cancers de sein et qui pourront bénéficier de traitement combiné d'inhibiteur de PARP-1 et d'irradiation.

2ème Partie : Impact de l'inhibition de l'activité PARP et/ou de la déplétion de PARP-1 et PARP-2 sur le recrutement des facteurs du BER et du SSBR après photo-dommages

I. Introduction

Comme PARP-1, PARP-2 est une poly(ADP-ribose) polymérase impliquée dans le BER et le SSBR, mais qui contribue seulement de 10 à 15% de l'activité PARP des cellules humaines (12). La mise en évidence du rôle précis de PARP-2 comme PARP-1 dans les processus de réparation des lésions de l'ADN est d'une grande importance pour l'amélioration du potentiel thérapeutique de l'inhibition des PARPs. L'utilisation des inhibiteurs des PARPs dans des lignées déficientes uniquement pour PARP-1 ou PARP-2 permet une approche comparative des rôles précis de ces deux protéines dans la réparation de l'ADN *in vivo*.

A mon arrivée dans l'équipe de J. HALL, le rôle exact de PARP-2 dans le BER et le SSBR, ainsi que les conséquences de sa déplétion ou de l'inhibition de son activité dans les cellules humaines restaient encore à élucider. La plupart des études menées, en dehors du laboratoire sur le rôle de PARP-2 dans la réponse aux dommages d'ADN étaient réalisées soit sur des cellules de souris ou de rongeurs (548), soit sur des cellules humaines mais basées majoritairement sur la réparation de lésions induites par H_2O_2 (156). Ceci ne répondait pas aux questions posées sur le rôle et l'importance de PARP-2 et de son activité en réponse aux radiations ionisantes dans les cellules humaines.

L'objectif principal de cette étude était donc d'élucider le rôle précis de PARP-2 dans le BER et le SSBR dans des cellules humaines. Afin de pouvoir atteindre notre objectif j'ai travaillé à élucider l'impact de la déficience de PARP-1 ou PARP-2 et/ou de l'inhibition de l'activité des PARPs sur :1) les cinétiques de recrutement de PARP-1 et XRCC1 (qui sont des facteurs du SPR), de PCNA (qui est la protéine clef dans le LPR) et de PARP-2 elle-même, 2) les cinétiques de réparation des CSBs et 3) la radiosensibilité des cellules HeLa Contrôles, PARP-1^{KD}, PARP-2^{KD} et Ligase I^{KD}. J'ai mesuré également l'activité PARP, l'activité PARG et le niveau des PARs dans les cellules Contrôles, PARP-1^{KD} et PARP-2^{KD}.

Pour cela grâce à notre collaboration avec le Dr. Denis Biard, nous avons pu étudier différents clones de la lignée HeLa invalidés de façon stable pour PARP-1, PARP-2, PARG et Ligase I. La technique utilisée par le Dr Denis Biard pour l'invalidation de la lignée HeLa pour PARP-1, PARP-2, PARG et Ligase I est la même utilisée pour Cdk5 (voir Résultats 1ère partie – Introduction).

Le recrutement et le suivi en temps réel des facteurs du BER (PARP-1, PARP-2, XRCC1 et PCNA) après transfection des cellules (Contrôles, PARP-1^{KD}et PARP-2^{KD}) par le plasmide d'intérêt couplé à la GFP ou YFP ont été faits, comme dans le papier n° 1, par vidéo-

microscopie après induction des dommages de bases, CSBs et CDBs localisées par micro-irradiation en utilisant un laser à 402 nm (201,525).

L'analyse de l'incidence et des cinétiques de religation des CSBs radio-induites dans ces clones (Contrôles, PARP-1^{KD}, PARP-2^{KD} et Ligase I^{KD}) traités ou non traités avec un inhibiteur de PARPs (ANI), a été faite par élution alcaline. Nous avons choisi cette méthode à celle du test des comètes (*comet assay*) parce qu'elle permet i) un contrôle précis de la température (incubation à 37°C pendant des temps différent avant la lyse puis la lyse à des températures proches du 0°C afin de stopper la réparation), ii) un contrôle précis des cinétiques de religation grâce à un arrêt de la réparation de l'ADN par la lyse instantanée des cellules, iii) ainsi qu'une analyse statistique supérieure du fait que cette méthode concerne une large population cellulaire et non des cellules isolées.

La radiosensibilité des différents clones utilisés à été étudiée en absence où en présence d'un inhibiteur de PARP (ANI) en utilisant le test de survie clonogénique.

Au final, ce travail nous a permis d'explorer le rôle de PARP-2 dans le BER/SSBR et a mis en évidence une participation de PARP-2 dans le LPR, jamais décrite jusqu'à maintenant. Nous avons aussi montré que PARP-2 est un régulateur de l'activité de PARG et donc du niveau des PARs présents dans les cellules après induction de dommages de l'ADN. Les résultats d'élution alcaline montrent que la déplétion de PARP-2 n'a pas d'effet majeur sur la religation des CSBs, alors que son activité de poly(ADP-ribose)ylation est nécessaire pour la religation rapide des CSBs des cellules PARP-1^{KD} qui ont un SPR défectif.

II. Résultats

1. Article n° 2 : PARP-2 modulates PARP-1, XRCC1 and PCNA recruitment to DNA damage sites via the modification of PARG activity

PARP-2 modulates PARP-1, XRCC1, and PCNA recruitment to DNA damage sites via the modification of PARG activity

Mohammed-Tayyib Boudra[1,2,3], Celeste Bolin[1,2]*, Tomasz Zaremba[1,2**], Laurence Vaslin[1,2], Denis Biard[4], Fabrice P. Cordelières[1,5,6], Vincent Favaudon[1,2], Frédérique Mégnin-Chanet[1,2] and Janet Hall[1,2***]

[1]Institut Curie, Centre de Recherche, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France.
[2]Inserm, U612, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France.
[3]Université Paris-XI, Faculté de Médecine, F-94270, Le Kremlin Bicêtre, France.
[4]Commissariat à l'Energie Atomique, DSV-iRCM / INSERM U935, Institut A. Lwoff-CNRS, BP 8, F-94801 Villejuif cedex, France.
[5]CNRS, UMR3348, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France.
[6]Plateforme IBiSA d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Institut Curie, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay, France.

*Present address: Boise State University, Department of Biological Sciences, 1910 University Drive, Boise, ID, USA 83725.

**Present address: Polpharma SA. R&D Department, ul. Pelplińska 19. 83-200 Starogard Gdański, Poland.

***Corresponding author: Janet Hall, Inserm U612, Institut Curie-Recherche, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France.
janet.hall@curie.fr
Tel: +33 (0)169863061
Fax: +33 (0)169075327

For Peer Review

Running title: PARP-2 depletion and DNA damage responses
Keywords: Base excision repair, Single Strand Break Repair, Poly(ADP-ribose), PARP-1 and PARP-2, PARG, Ionizing Radiation.

ABSTRACT

Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) activity contributes 10 to 15% of a cells' poly(ADP-ribosyl)ating potential and like PARP-1, has been implicated in base excision repair (BER) and DNA single strand break repair (SSBR). Using HeLa cells depleted in PARP-1 or PARP-2 and a laser micro-irradiation and live-cell microscopy technique we found that PARP-2 is necessary for the maximal recruitment of PARP-1 and XRCC1, and also PCNA to DNA photo-damage sites. In contrast, PARP-2 recruitment is uncompromised in the absence of PARP-1. These results suggest that PARP-2 plays a role in both the short-patch and long-patch BER sub-pathways. The altered PARP-1 and XRCC1 recruitment is likely a consequence of higher polymer levels found in PARP-2 depleted cells after exposure to ionizing radiation (IR), which correlates with a concomitant reduction in poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) activity. This result suggests that PARP-2 is also a regulator of PARG activity and taken together with recent publications suggesting that PARG interacts with PCNA to regulate long-patch BER, we hypothesize that PARP-2 may also be involved in this regulation. However despite PARP-2's involvement in both short-patch and long-patch BER sub-pathways and its impact on PARG activity, PARP-2 depletion did not affect the kinetics of IR-induced SSBR or radiation sensitivity.

For Peer Review

INTRODUCTION

Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) is a DNA single-strand break (SSB) detector which plays a key role in the signaling of these lesions and in the base excision repair (BER) and SSB repair (SSBR) pathways (1-5). The observation that cells from *Parp1* knock-out (KO) mice were capable of synthesizing polymers of ADP-ribose (PAR) (6,7) led to the isolation of a second PARP, PARP-2, implicated in the cellular response to DNA damage (6). *Parp1* and *Parp2* KO mice are viable but embryonic lethality is seen in the double KO mice, which suggests that there is some overlap in their cellular activities as DNA damage sensors and signal transducers in the SSBR and BER pathways (8,9, for a review see 10). The activation of PARP-1 and PARP-2, through their binding to DNA strand interruptions, catalyses the transfer of ADP-ribose moieties from NAD^+ to acceptor proteins, resulting in the attachment of linear or branched PAR. The vast majority (approximately 85%) of the poly(ADP-ribosyl)ation detected after genotoxic stress induced by alkylating agents or ionizing radiation (IR) is carried out by PARP-1, with PARP-2 activity contributing only 10 to 15% (6,7,9). Both PARP-1 and PARP-2 are themselves targets for poly(ADP-ribosyl)ation and this auto-modification plays a key role in the control of their activity and localization. In addition some proteins have a high affinity for poly(ADP-ribosyl)ated proteins or the polymers themselves which is exploited by certain mechanisms, such as DNA repair, for the control of the localization of proteins including XRCC1 (see 11-13 and references there in). XRCC1 interacts physically and functionally with practically all the actors of the BER and SSBR pathways (9,14,15) and in particular with those implicated in the Short Patch (SP) BER sub-pathway. XRCC1 also negatively regulates the activity of PARP-1 and PARP-2 by limiting their auto-modification and thus forcing them to reside on the DNA damage site (9). In MEFs lacking *Parp2,* XRCC1 is recruited normally to the SSBs, which is in contrast to its very slow recruitment in *Parp1* deleted MEFs (16). These results, taken together with the observation that PARP-2 is recruited more slowly than PARP-1 and persists longer at the DNA damage site in MEFs and HeLa cells (16), suggest that XRCC1 recruitment depends mainly on PARP-1. However questions remain as to whether PARP-2 can influence the recruitment of XRCC1 in human cells. Indeed the differences in the affinities and kinetics of recruitment of PARP-1 and PARP-2 suggest that each protein contributes differently to the SSBR and BER mechanisms. Extensive studies on PARP-1 have allowed its role in these two repair mechanisms to be well defined (for a review see 17), in addition to its involvement in other repair mechanisms such as the alternative NHEJ (18-20). In contrast, PARP-2 has long been considered only as a SP BER sub-pathway factor (13) and its role in the alternative Long Patch (LP) BER sub-pathway remains to be fully elucidated and in particular in human cells.

The PARs generated in response to DNA strand breaks are subsequently and rapidly degraded by the action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). Constitutive PARG depletion and subsequent PAR accumulation are rather beneficial in that they protect cells from spontaneous SSBs and telomeric abnormalities (21). In contrast, irradiation of PARG depleted cells triggers PAR accumulation, delayed SSB and DSB repair, centrosome amplification, and mitotic defects, all of which contribute to cell death by mitotic catastrophe (21). PARG has also been shown to regulate cell death in oxidatively stressed cells and PARG knockdown was found to result in reduced PARP activation after exposure to hydrogen peroxide suggesting that auto-poly(ADP- ribosyl)ation indeed down-regulates PARP-1 activity (22). These findings demonstrate the close interplay between PARG and PARP-1

For Peer Review

activity, which also physically interact (23). However it remains unknown whether PARP-2 interacts, functionally and/or physically, with PARG.

The aim of this study was thus to elucidate the precise role of PARP-2 in BER and SSBR in human HeLa cells. In order to do this we investigated the effects of PARP activity inhibition and/or PARP-1 or PARP-2 depletion on (i) the recruitment kinetics of PARP-1 and XRCC1, SP BER factors, and PCNA a key protein in LP BER, as well as PARP-2 itself and (ii) the kinetics of SSBR and cell survival after exposure to IR. Our results showed that PARP-2 is involved in both the SP and LP BER sub-pathways and that its presence is necessary for the maximum recruitment of PARP-1, XRCC1, and PCNA to sites of DNA laser-damage. We found that PARP-2 modulates the recruitment of PARP-1 and XRCC1 likely through a mechanism involving the regulation of the glycohydrolase activity of PARG and thus the levels of PAR. However despite these differences in the recruitment kinetics of BER components, PARP-2 depletion did not affect the overall SSBR kinetics or radiation sensitivity.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines, gene silencing and drugs

shRNA design and cloning in pEBVsiRNA vectors carrying a hygromycin B resistance cassette and establishment of stable knockdown clones for PARP-1 (PARP-1^{KD}), PARP-2 (PARP-2^{KD}) and PARG (PARG^{KD}) and Control HeLa clones by selection and amplification of resistant colonies to hygromycin B was carried out as previously described (21,24,25). HeLa cells carrying the pBD650 plasmid that expressed an inefficient shRNA sequence were used as Controls (24). The RNAi targeted sequences for PARP-1 (NM_001618), PARP-2 (NM_005484) and PARG (NM_003631) were nucleotides 2068–2086, nucleotides 1379–1397 and nucleotides 2325-2343 respectively. All HeLa cells clones were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FCS, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin in the presence of 125 µg/ml hygromycin B at 37°C under 5% CO_2. All tissue culture reagents were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France) and the PARP inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide (ANI) was purchased from Acros Organics (Geel, Belgium).

Western blotting

Total protein extraction was obtained from the different cell lines using the M-PER (Pierce, Perbio Science, Brebières, France) reagent supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Protein concentrations were measured by the Bradford method using the Bio-Rad protein assay. Following denaturing extracts (40 µg/lane, 95°C, 5 min) in Laemmli loading buffer and separation on 7.5% SDS-PAGE gels, proteins were electro-transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% non-fat milk for 1 h at room temperature, and then incubated with the primary antibodies (ALX-210-303-Yuc anti-PARP-2 from ALEXIS Biochemicals, Villeurbanne, France; and B01P anti-PARG from Abnova, Heidelberg, Germany) overnight at 4°C and with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Soham, Cambridgeshire, UK) for 1 h at room temperature. Membranes were probed with an enhanced chemi-luminescence reagent and re-hybridized with anti-α-tubulin antibody (clone DM1A, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

For Peer Review

Colony formation survival assays

For clonogenic survival assays, Control and PARP-2^{KD} cell lines were seeded at 1 x 10^3 cells in 25 cm^2 flasks, incubated at 37°C for 3 to 5 h to allow cell adhesion and then irradiated at room temperature using an IBL-637 (^{137}Cs) irradiator (CIS-Biointernational) at a dose-rate of 0.70 Gy/min. Colonies were allowed to grow for 10-15 days, before fixing with methanol, staining with Coomassie, and counting. Small colonies (less than 50 cells) were disregarded. The colony count relative to mock-irradiated cells (S) was adjusted for best fit to the classical linear-quadratic equation ($Ln\ S = -\alpha.D - \beta.D^2$) where D is the radiation dose and α and β adjustable parameters characterizing radiation response. Calculations were made through nonlinear least-squares regression taking all data points into account, using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, Pennsylvania).

Expression plasmids and transfection

pEGFP-PARP-1 and pEGFP-PARP-2, pEGFP-NLS-PCNA, XRCC1-pYFP, plasmids were a kind gift from Drs. V. Schreiber (UMR7175CNRS, ESBS, Illkirch, France), P.Kannouche (FRE2939 CNRS, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France) and P. Radicella (IRCM, CEA-DSV, Fontenay-aux-Roses, France) respectively. Plasmids were purified using a Macherey Nagel NucleoBond® PC 500 EF kit (Düren, Germany). For live cell experiments cells were plated at 50% confluence onto 25 mm round glass coverslips and then transfected 24 h later using JETPEI (Polyplus transfection, Ozyme, St. Quentin en Yvelines, France) according to the manufacturer's recommendations and cultured for a further 48 h before use.

Live-cell videomicroscopy

The recruitment and the real-time follow-up of the protein of interest was carried out through a Confocal Leica SP5 system attached to a DMI6000 stand using 63x/1.4 objective. During experiments glass coverslips containing transfected cells were mounted in a Ludin Chamber and maintained at 37°C. All recordings were made using the appropriate sampling frequency (512 x 512 images, line average of 4 and zooming set to 7.94). DNA photo-damage was generated using a 402 nm laser line (diode) focused onto a single spot of constant size (176 nm) within the nucleus to generate a point of photo-damage with a constant amount of energy. GFP and YFP fluorophores were excited using a 488 nm Argon-laser line and a 561 nm DPSS laser line. Recruitment of the protein of interest was then monitored by fluorescence using the same setting as for the pre-damage sequence. Nomarski contrast images were taken in parallel. Images were captured at 2 to 5 s interval, except in a few instances where GFP-PARP-1 foci images were taken each at 5 min intervals to avoid photo-bleaching.

Photo-damage kinetics were analysed under the ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2011) using an in house developed macro. Data extraction is a semi-automated process where the user is first invited to draw two regions of interest (ROI): a nuclear region and the site of photo-damage. The background ROI is automatically set to the inverse of the nuclear ROI. For each time point, the integrated intensity is extracted from the three ROIs. Intensity from the photo-damage site is corrected for both the observational photo-bleaching and background, and normalized so that its intensity at start-up equals 1: corrected intensity = ((focus intensity (t)-background intensity(t)*focus area/background area)*nuclear intensity(t))(focus intensity(t0)*nuclear intensity(t0). The time-point of induction of the photo-damage is extracted

For Peer Review

from the normalized curve by determining when the maximum change in intensity is achieved between two successive images. The normalized time course from the damage on was fitted to a mono-exponential recovery of the form y=a(1-exp(-k*t))+b which allows the estimation of the half-time maximum recruitment ($t_{1/2}$=(ln2)/k) as well as the expected maximum recruitment (max=a+b).

Immunofluorescence detection of PAR formation

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

Measurements of PARP and PARG activity

Total PARP activity was measured in triplicate as described by Zaremba *et al.* (26) using $5x10^3$ digitonin-permeabilised cells in a reaction mixture containing 350 µM NAD^+ and 10 µg/ml oligonucleotide. After blotting onto a nitrocellulose membrane, the PAR was detected following incubation with the primary anti-PAR 10H antibody (Alexis), then with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and finally visualisation using the ECL^+ detection kit (GE Healthcare). PARG activity was measured in cell extracts using a commercially available kit (HT Chemiluminescent PARG Assay Kit, Trevigen) according to manufacturers' instructions. Briefly, the relative PARG activity in cell extracts was measured by the quantification of the loss of biotinylated PAR from histones attached to strip wells in a 96 well format.

Analysis of SSB repair by alkaline filter elution

The measurement of radiation-induced SSBs made use of alkaline filter elution over polycarbonate filters based on the technique of Filipski and Kohn (27). This technique allows titration of direct SSBs, alkali-labile and abasic sites altogether. Cells were grown in the presence of [2-^{14}C] thymidine (0.05 µCi/ml) (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). After 36 h, the medium containing radioactive thymidine was changed for medium without radioactive thymidine and cells were returned to the incubator for at least two hours. The culture flasks were subsequently exposed to 5 Gy gamma-rays at a dose-rate of 2.64 Gy/min at room temperature (with the exception for the zero-time point which was exposed on ice to prevent SSB rejoining) in the presence or not of 30 µM ANI and returned to the incubator for varying times (up to 4 h). At the end of the incubation period, the medium was

For Peer Review

removed and the flasks rapidly rinsed once with ice-cold PBS-EDTA (10 mM EDTA), and maintained on ice for no more than 10 min before harvesting with the aid of a cell scraper. $8x10^5$ cells were deposited onto polycarbonate filters, lyzed and DNA fragments eluted and counted by liquid scintillation. Each measurement was performed in duplicate.

Statistics

Data presented was analyzed with StatEL software (AD Science, Paris, France) using unpaired t-tests with *P* being the calculated error risk.

RESULTS

PARP-2 modulates the recruitment of the Short Patch Repair proteins PARP-1 and XRCC1.

To investigate the role of PARP-2 in the SP BER sub-pathway in human cells, we analyzed the dynamics of the recruitment and the dissociation of PARP-1 and XRCC1 to laser induced DNA damage sites using a panel of isogenic HeLa cell lines in which PARP-2 or PARP-1 expression was specifically depleted.

Insert Figure 1: PARP-2 enhances the recruitment of PARP-1 at the site of DNA photo-damage.

First we investigated whether PARP-2 can influence the recruitment kinetics of PARP-1 by following, in real time, the recruitment of transiently transfected GFP-PARP-1 in HeLa Control and PARP-2^{KD} cells. As has been previously reported by several groups using similar experimental conditions (16,28-31) GFP-PARP-1 shows a rapid accumulation at the site of photo-damage immediately after micro-irradiation in Control cells. This accumulation was transient, as the relative intensity of the PARP-1 gradually decreased after reaching a maximum at about 50 s post micro-irradiation as previously described (16). In comparison, PARP-1 is recruited to a lesser total amount to the site of DNA photo-damage in PARP-2 depleted cells (relative spot intensity reached at 300 s was 1.30 ± 0.15 (n = 20 cells) for $PARP2^{KD}$ cells *vs.* 1.66 ± 0.17 (n = 18 cells) for control cells, $P<10^{-5}$) (Figure 1A panels 1 and 3, and 1B). These results would suggest that PARP-2 is necessary for a maximal PARP-1 recruitment to DNA damage sites. However, based on the shape of the decay curves seen from 50 sec following micro-irradiation, PARP-1's dissociation from the damage sites occurs with the same kinetics in both cell types: in both the calculated dissociation slope was 0.023 s^{-1} (Figure 1B lower curves).

We next investigated whether PARP activity was necessary for this recruitment by pre-treating the cells with the PARP inhibitor ANI. The presence of ANI causes an accumulation and a persistence of PARP-1 recruited at the site of photo-damage in both Control and PARP-2^{KD} cells (Figure 1A panels 2 and 4, and 1B). The dissociation and the persistence of GFP-PARP-1 in the absence or the presence of ANI respectively in both Control and PARP-2^{KD} cell lines (Figure 1B) suggest that the dissociation of PARP-1 is PARP activity dependent.

Insert Figure 2: Both PARP-1 and PARP-2 are necessary for the optimal recruitment of XRCC1 at the site of DNA damage.

For Peer Review

Various studies have demonstrated that the recruitment of XRCC1 to DNA damage sites is PARP-1 and/or PARP activity dependent (16,29,30,32-35). As PARP-1 is the most abundant PARP isoform in cells, most published studies have focused on the necessity of its presence for the recruitment of XRCC1 and have neglected the possible role of PARP-2 with the exception of a study by Mortusewicz *et al.* (16), which showed no differences in the recruitment dynamics of XRCC1 between control and *Parp2* deficient MEFs cells. Our finding that the absence of PARP-2 delays PARP-1 recruitment in response to DNA damage in HeLa cells led us to investigate whether PARP-2 and PARP activity has an effect on the recruitment of XRCC1 to DNA damage sites in this human cell model system. To do this we micro-irradiated Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} HeLa cells in the absence or presence of the PARP inhibitor ANI and followed the recruitment of fluorescent tagged XRCC1. As previously reported XRCC1 recruitment largely depends on the presence of PARP-1 (Figure 2A panels 1 and 2, and 2B) and PARP activity (Figure 2A panels 4, 5 and 6, and 2B), with very little recruitment (maximal relative spot intensity reached was 1.94 ± 0.32 (n = 20 cells)) being seen in the PARP-1^{KD} cells (Figure 2A panels 2 and 3). However the recruitment of XRCC1 to the site of micro-irradiation was also shown to reach lower maximal levels in PARP-2^{KD} cells as compared to control cells (maximal relative spot intensity reached was 4.1 ± 0.58 (n = 19 cells) for PARP-2^{KD} cells *vs*. 6.35 ± 0.9 (n = 23 cells) for Control cells) (Figure 2A panels 1 and 3). These results suggests that PARP-2 does in fact contribute to XRCC1 recruitment to the site of DNA photo-damage and that it is necessary to obtain the maximum recruitment profile seen in Control cells.

Insert Figure 3: PARP-2 regulates the poly (ADP-ribose) polymers via the modulation of PARG activity.

One possible explanation for these impaired PARP-1 and XRCC1 recruitment profiles could be that the absence of PARP-2 influences the level of polymer formed in response to DNA damage either by modulating PARP or PARG activity. Modulation of either or both of these activities would be expected to influence the dynamics of protein recruitment at sites of DNA damage by modulating the charge repulsion between the DNA and poly(ADP-ribosyl)ated proteins. To investigate the impact of PARP-2 depletion on PAR levels in human cells after DNA damage, we measured PAR formation by immunofluorescence after exposure to IR and found that there is a statistically higher level of PAR in the irradiated PARP-2^{KD} cells compared to the irradiated HeLa Control cells ($P<10^{-5}$, n = 500 cells) (Figure 3A and B).

To elucidate how PARP-2 might regulate PAR metabolism we analyzed both PARP and PARG activities in HeLa Control, PARP-2^{KD}, or PARP-1^{KD} cells. The results of *in vitro* experiments measuring the maximum PARP activity in whole cell extracts shows that the depletion of PARP-2 results in a slight (15%) reduction of synthesized PAR compared to the PAR level detected in Control extracts (Figure 3C). This result is in agreement with previous studies showing a relatively small contribution of PARP-2, compared to the significant contribution of PARP-1, to the total PARP activity of the cell (6,7). However, this result does not explain the higher PAR levels found in IR-treated PARP-2^{KD} cells. In order to test whether a decrease in PARG activity could be at the origin of this difference we analysed PARG activity in the PARP-2^{KD} cells using an *in vitro* assay. In the absence of PARP-2 less hydrolysis of PAR was detected in cell extracts from both irradiated ($P<10^{-3}$, n = 6 extracts) and non-irradiated ($P<10^{-5}$, n = 6 extracts) cells compared to cell extracts from Control cells with and without the same radiation

For Peer Review

treatments (Figure 3D). Analysis of total PARG protein levels showed no difference in PARG protein expression in the presence or in absence of PARP-2 (Figure 3E). These results suggest that PARP-2 affects the enzymatic activity of PARG without modulating its total expression.

PARP-2 is involved in the Long Patch BER sub-pathway in addition to the SP BER sub-pathway.

As shown and discussed above, PARP-2 is recruited to the sites of SSBs in human and mouse cells and is involved in the SP BER sub-pathway. However the question remains whether PARP-1 and/or PARP activity affects this recruitment and whether PARP-2 contributes to the LP BER sub-pathway. In order to address these questions we examined the recruitment profiles of GFP-tagged PARP-2 to the sites of laser-induced DNA damage in PARP-1^{KD} cells and of GFP-tagged PCNA in PARP-2^{KD} cells.

Insert Figure 4: PARP-2 is recruited normally to the site of DNA damage in cells with defective SP repair.

Our results obtained after micro-irradiation of transiently transfected HeLa Control cells with GFP-PARP-1 or GFP-PARP-2 showed that PARP-2 is recruited slower and persists longer than PARP-1 (Supplementary Figure S1) which is in close agreement with previous findings (16). Results also showed a similar recruitment and dissociation profile of GFP-PARP-2 in both Control and PARP-1^{KD} cell lines at sites of micro-irradiation with or without treatment with the PARP inhibitor ANI (Figure 4). Taken together these results suggest that in HeLa cells PARP-2 recruitment does not depend on the presence of PARP-1. Thus, the normal recruitment profile of PARP-2 in PARP-1^{KD} cells, which are known to have a defective SP BER sub-pathway (30), led us to hypothesise that PARP-2 has a role in the LP BER sub-pathway that could provide an alternative repair mechanism for SSBs.

Insert Figure 5: PARP-2, but not PARP-1, is necessary for the optimal recruitment of PCNA.

To investigate whether PARP-2 is involved in LP repair we used the same method of live-cell video microscopy, to study the consequences of PARP-1 and PARP-2 depletion on the recruitment dynamics of PCNA, one of the key LP repair proteins. In Control cells very little GFP-PCNA recruitment was initially seen at the micro-irradiation site compared to the levels seen for XRCC1-YFP (Supplementary Figure1). This was followed by a gradual increase in GFP-PCNA levels (Figure 5 and Supplementary Figure S1), which is similar to the recruitment profiles previously reported by several groups (31,36,37). In contrast whilst PARP-1 depletion did not affect the recruitment of PCNA (Figure 5A panels 1 and 2, and 5B), in agreement with previous observations (16,30), PARP-2 depletion significantly reduces ($P<10^{-5}$) the recruitment of PCNA (Figure 5A panels 1 and 3, and 5B). These results suggest that PARP-2 is essential for the maximal recruitment of PCNA, implicating PARP-2 as a player in the LP BER sub-pathway.

PARP-2 has a minor role in global SSBR compared to PARP-1.

For Peer Review

In order to assess the outcomes of PARP-2 depletion and inhibition on overall SSBR we used the technique of alkaline elution to determine, with high precision, the kinetics of SSBR.

Insert Figure 6: PARP-2 activity is important for the rapid SSBR in cells with defective SP repair.

Using this technique (Figure 6A) we found that the SSBs generated following exposure to 5 Gy IR are rapidly religated in HeLa control, PARP-1^{KD} or PARP-2^{KD} cells. SSBR is slowed and incomplete in both PARP-2^{KD} and HeLa control cells treated with ANI. This could be explained by the retention of PARP-1 and PARP-2 at the sites of DNA damage as observed in the micro-irradiation experiments (Figures 1 and 4). In PARP-1^{KD} cells treated with ANI such that the remaining PARP activity originating from PARP-2 (and eventually PARP-3 which is however expressed at very low levels in HeLa cells) was inhibited, repair is slower compared to the profile seen in the same non-treated cells. It has been previously shown that cells lacking PARP-1 utilize the LPR pathway of SSBR and can efficiently resolve all single strand breaks under similar experimental conditions (30). Therefore the decrease in SSBR in PARP-1^{KD} cells treated with PARP inhibitor could be interpreted in support of a role of PARP-2 in the rapid repair of SSBs in cells using the LPR. However, we cannot exclude the possibility that the delay in SSBR seen in the presence of either PARP-1 or PARP-2 inhibition is due to a steric hindrance generated by the accumulation of proteins, including both PARP-1 and PARP-2, at the damage site. This could partially explain why the repair is less hindered in the PARP-1^{KD} cells compared with the Control or PARP-2^{KD} cells in the presence of ANI given the relative proportion of the two PARPs in the HeLa cells.

To investigate whether HeLa cells lacking PARP-2 are sensitive to the killing effect of IR we tested the sensitivity of HeLa Control and PARP-2^{KD} cells using clonogenic survival as an end-point (Figure 6B). Results showed an equal surviving fraction after radiation as a function of the dose. Thus, in contrast to mouse cells (8), the depletion of PARP-2 in HeLa cells did not result in an increase in radiation sensitivity.

DISCUSSION

Poly(ADP-ribosyl)ation regulates the activity of several proteins involved in different cellular processes including DNA repair and cell death. Whilst the involvement of PARP-1 in both the BER and SSBR pathways is well documented, the role of PARP-2 in these processes is less well characterised. In this present study we confirm the findings of Mortusewicz *et al*. (16) that PARP-2 is recruited slower and persists longer than PARP-1 at localized DNA damage sites clearly supporting its role in SSBR. We also show for the first time that the presence of PARP-2 is necessary for the maximal recruitment of PARP-1 suggesting a cross-talk between the two proteins. PARP-1 and PARP-2 have been shown to heterodimerise (9) but the observation that in the absence of PARP-1, no changes in the recruitment of PARP-2 were seen argues against them only acting as heterodimers in the DNA damage response. One possible explanation for the altered PARP-1 recruitment to DNA damage sites and the reduced XRCC1 recruitment observed was that the absence of PARP-2 influences the level of polymer in the cells formed in response to DNA damage either by modulating PARP or PARG activity. Indeed, the recruitment and persistence of PARP-1 and XRCC1 at damage sites depends on the balance of charge repulsion between the DNA and the polymers, although it must be noted that PARP-2 has been shown to directly interact with XRCC1 (9).

For Peer Review

Thus the absence of PARP-2 may account in part for the reduced XRCC1 recruitment observed in our experimental model. The finding of higher PAR formation in cells lacking PARP-2 after treatment with IR, in a background of only a small reduction in PARP activity associated with the absence of PARP-2, and a concomitant decrease in PARG activity that was not seen in PARP-1 depleted cells, would support the hypothesis that PARP-2 can modulate PARG activity. One possible mechanism would be that PARP-2 may poly(ADP-ribosyl)ate the PARG protein resulting in a reduction in its activity. The specificity of PAR-protein binding can depend on the chain length of the PAR (38) but it is not well established whether the PARs formed by PARP-1 and PARP-2 show differences allowing such a fine tuning of PARG activity. An alternative possibility is *via* a direct protein-protein interaction; however the lack of specific anti-PARG antibodies precludes the investigation of any such endogenous PARP-2/PARG complexes.

The counter-balancing of the activities of the PARPs and PARG is not only essential for post-translational poly(ADP-ribosyl)ation but directly impacts on their recruitment to DNA damage sites. Mortusewicz *et al.* (31) have shown that PARG is recruited to DNA damage sites through both poly(ADP-ribose) and PCNA-dependent mechanisms. They found that PARG interacts with PCNA and that through this interaction PARG is recruited to DNA damage sites and proposed that this dual recruitment contributes to the dynamic regulation of this post-translational modification and DNA repair processes. Our results suggest that PARP-2 is also a key player in this process, as in its absence the recruitment of PARP-1, XRCC1, and PCNA to DNA damage sites are all compromised. It has been suggested (31) that the PCNA-dependent accumulation of PARG at DNA damage sites could be an additional regulatory level for the LP BER sub-pathway. The link shown here between PARP-2 and PARG would suggest that PARP-2 may also participate in this regulation.

As discussed above, based on its interaction with PARP-1, XRCC1, DNA polymerase beta, and DNA ligase III, PARP-2 was considered to be involved in the SP BER sub-pathway (9). However the observations that PARP-1^{KD} cells show normal recruitment kinetics of PARP-2 (Figure 4) and the decrease in SSBR in PARP-1^{KD} cells treated with PARP inhibitor could be interpreted to mean that PARP-2 can also participate in the LPR pathway providing an alternative repair mechanism for SSBs when SP repair is defective. However, whilst PARP-2 depletion affects the recruitment kinetics of both SP and LP repair proteins, the changes are not sufficient to have an impact on global SSBR or cell survival after exposure to ionising radiation (Figure 6A and B). These observations are in agreement with those of Fisher *et al.* (5) who showed that the depletion of PARP-2 in human A549 cells had only a minor impact on SSBR and cell survival after exposure to H_20_2.

The results presented here also highlight several differences between the activity of PARP-2 in human and mouse models. In contrast to the results obtained with HeLa cells, Mortusewicz *et al.* (16) found no differences in the recruitment dynamics of XRCC1 between control and *Parp2* deficient MEFs cells. Additionally Schreiber *et al.* (9) found that the polymer level detected by immunofluorescence in *Parp2*$^{-/-}$ MEF cells treated with H_2O_2 or MNU was comparable to that seen in treated *Parp2*$^{+/+}$ MEF cells. In the same *Parp2*$^{-/-}$ MEF model a significant delay in DNA strand break sealing after exposure to MNU, as measured by the Comet assay, was found and *Parp2* KO mice and *Parp2*$^{-/-}$ mouse 3T3 fibroblasts were sensitive to the cell killing effects of IR (8 and reviewed in 39). Whether these species specific differences associated with PARP-2 depletion reflect the presence or absence of other enzymatic activities that might modulate PARP or PARG activity remains to be established.

For Peer Review

In summary, our study reveals that PARP-2 plays a role in the regulation of poly(ADP-ribosyl)ation through the modulation of PARG activity and thus the level of PAR present after DNA damage. Taken together with the finding that PARG interacts with PCNA to regulate long-patch BER (31), we hypothesize that PARP-2 may also be involved in this regulation, as well as participating in both the SP and LP BER pathways as shown by the compromised PARP-1, XRCC1 and PCNA recruitment to DNA damage sites in PARP-2^{KD} cells.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online: supplementary figure S1.

FUNDING

This work was supported by funding from INSERM and Institut Curie (to Inserm U612, Institut Curie); a PhD student fellowship from the Presidency of the University of Paris-Sud XI (MTB); Institute Curie's International Postdoctoral fellow program (CB; TZ); a fellowship from the Fondation Pierre-Gilles de Gennes (TZ).

For Peer Review

REFERENCES

1. Ding, R., Pommier, Y., Kang, V.H. and Smulson, M. (1992) Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining. *J. Biol. Chem.*, **267**, 12804-12812.
2. Trucco, C., Oliver, F.J., de Murcia, G. and Menissier-de Murcia, J. (1998) DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2644-2649.
3. Beneke, R., Geisen, C., Zevnik, B., Bauch, T., Muller, W.U., Kupper, J.H. and Moroy, T. (2000) DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to Poly(ADP-ribosyl)ation but have different requirements for p53. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6695-6703.
4. Vodenicharov, M.D., Sallmann, F.R., Satoh, M.S. and Poirier, G.G. (2000) Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 3887-3896.
5. Fisher, A.E., Hochegger, H., Takeda, S. and Caldecott, K.W. (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 5597-5605.
6. Ame, J.C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G. (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17860-17868.
7. Shieh, W.M., Ame, J.C., Wilson, M.V., Wang, Z.Q., Koh, D.W., Jacobson, M.K. and Jacobson, E.L. (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30069-30072.
8. Menissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Ame, J.C., Dierich, A., LeMeur, M. *et al.* (2003) Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *The EMBO journal*, **22**, 2255-2263.
9. Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J. Biol Chem.*, **277**, 23028-23036.
10. Yelamos, J., Schreiber, V. and Dantzer, F. (2008) Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends in Molecular Medicine*, **14**, 169-178.
11. Althaus, F.R., Kleczkowska, H.E., Malanga, M., Muntener, C.R., Pleschke, J.M., Ebner, M. and Auer, B. (1999) Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism. *Mol. Cell. Biol.*, **193**, 5-11.
12. Malanga, M. and Althaus, F.R. (2005) The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochem. Cell Biol.*, **83**, 354-364.
13. Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C. and de Murcia, G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 517-528.
14. Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P. and Shall, S. (1996) XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res.,* **24**, 4387-4394.
15. Keil, C., Grobe, T. and Oei, S.L. (2006) MNNG-induced cell death is controlled by interactions between PARP-1, poly(ADP-ribose) glycohydrolase, and XRCC1. *J. Biol. Chem.*, **281**, 34394-34405.
16. Mortusewicz, O., Ame, J.C., Schreiber, V. and Leonhardt, H. (2007) Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7665-7675.
17. Woodhouse, B.C. and Dianov, G.L. (2008) Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair*, **7**, 1077-1086.
18. Audebert, M., Salles, B. and Calsou, P. (2008) Effect of double-strand break DNA sequence on the PARP-1 NHEJ pathway. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **369**, 982-988.
19. Robert, I., Dantzer, F. and Reina-San-Martin, B. (2009) Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J. Experimental Medicine*, **206**, 1047-1056.
20. Mansour, W.Y., Rhein, T. and Dahm-Daphi, J. (2010) The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res.,* **38**, 6065-6077.

For Peer Review

21. Ame, J.C., Fouquerel, E., Gauthier, L.R., Biard, D., Boussin, F.D., Dantzer, F., de Murcia, G. and Schreiber, V. (2009) Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells. *J. Cell Sci.,* **122**, 1990-2002.
22. Erdelyi, K., Bai, P., Kovacs, I., Szabo, E., Mocsar, G., Kakuk, A., Szabo, C., Gergely, P. and Virag, L. (2009) Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. *Faseb J*, **23**, 3553-3563.
23. Keil, C., Petermann, E. and Oei, S.L. (2004) Tannins elevate the level of poly(ADP-ribose) in HeLa cell extracts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **425**, 115-121.
24. Biard, D.S., Despras, E., Sarasin, A. and Angulo, J.F. (2005) Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol. Cancer Res*, **3**, 519-529.
25. Biard, D.S. (2007) Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res.,* **35**, 3535-3550.
26. Zaremba, T., Thomas, H.D., Cole, M., Coulthard, S.A., Plummer, E.R. and Curtin, N.J. (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) pharmacogenetics, activity and expression analysis in cancer patients and healthy volunteers. *Biochem. J.*, **436**, 671-679.
27. Filipski, J. and Kohn, K.W. (1982) Ellipticine-induced protein-associated DNA breaks in isolated L1210 nuclei. *Biochim. Biophys. Acta*, **698**, 280-286.
28. Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S.H. and Yasui, A. (2004) In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13738-13743.
29. Gagne, J.P., Isabelle, M., Lo, K.S., Bourassa, S., Hendzel, M.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Poirier, G.G. (2008) Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6959-6976.
30. Godon, C., Cordelieres, F.P., Biard, D., Giocanti, N., Megnin-Chanet, F., Hall, J. and Favaudon, V. (2008) PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4454-4464.
31. Mortusewicz, O., Fouquerel, E., Ame, J.C., Leonhardt, H. and Schreiber, V. (2011) PARG is recruited to DNA damage sites through poly(ADP-ribose)- and PCNA-dependent mechanisms. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5045-5056.
32. Caldecott, K.W. (2003) XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*, **2**, 955-969.
33. El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H. and Caldecott, K.W. (2003) A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 5526-5533.
34. Okano, S., Lan, L., Caldecott, K.W., Mori, T. and Yasui, A. (2003) Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 3974-3981.
35. Quenet, D., El Ramy, R., Schreiber, V. and Dantzer, F. (2009) The role of poly(ADP-ribosyl)ation in epigenetic events. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 60-65.
36. Essers, J., Theil, A.F., Baldeyron, C., van Cappellen, W.A., Houtsmuller, A.B., Kanaar, R. and Vermeulen, W. (2005) Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 9350-9359.
37. Overmeer, R.M., Gourdin, A.M., Giglia-Mari, A., Kool, H., Houtsmuller, A.B., Siegal, G., Fousteri, M.I., Mullenders, L.H. and Vermeulen, W. (2010) Replication factor C recruits DNA polymerase delta to sites of nucleotide excision repair but is not required for PCNA recruitment. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 4828-4839.
38. Fahrer, J., Kranaster, R., Altmeyer, M., Marx, A. and Burkle, A. (2007) Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e143.
39. Huber, A., Bai, P., de Murcia, J.M. and de Murcia, G. (2004) PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair*, **3**, 1103-1108.

For Peer Review

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Recruitment of PARP-1 in HeLa Control and PARP-2^{KD} cells to laser damage sites (A) Representative images of the recruitment of fluorescent tagged PARP-1 to DNA damage sites in Control or PARP-2^{KD} cells treated with or without the PARP inhibitor ANI. Scale bar: 5 μm (B) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of GFP-PARP-1 of these recruitment profiles in Control cells (closed circles), Control cells + ANI (open circles), PARP-2^{KD} cells (closed squares) and PARP-2^{KD} cells + ANI (open squares). Data represents mean relative spot intensity ± SEM, *n=10-20* individual cells from two independent experiments, (C) Western blot analysis confirming stable depletion of PARP-2 in PARP-2^{KD} cells

Figure 2 Recruitment of XRCC1 in HeLa Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells to laser damage sites (A) Representative images of the recruitment of fluorescent tagged XRCC1 to DNA damage sites in Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells treated with or without the PARP inhibitor ANI. Scale bar: 5 μm (B) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of XRCC1-YFP of these recruitment profiles in Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells (closed circles, rhombi and squares) and Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells + ANI (open circles, rhombi and squares). Data represents mean relative spot intensity ± SEM, *n=12-23* individual cells from two independent experiments.

Figure 3 Modulation of PAR levels and PARG activity in HeLa PARP-2^{KD} cells (A) Representative images of PAR immunofluorescence in Control cells or PARP-2^{KD} cells before and after exposure to 8 Gy of IR (a, zooming set to 4) Scale bar: 10 μm. (B) Quantification of the PAR staining. Data represents the mean ± SD based on the fluorescence intensity in 500 cells/treatment group in two independent experiments *** $P<10^{-5}$. (C) PARP activity in permeabilised cells expressed as a % of the Control cells in two independent experiments (D) PARG activity in PARP-2^{KD} cells. The Relative Light Unit (RLU) values correspond to the amount of PAR polymer that has not been hydrolysed during a 30 min incubation with a protein extract prepared from untreated or cells treated with 8Gy IR. Data are mean ± SD for two independent experiments in triplicate and show that in PARP-2^{KD} cells PARG activity is reduced *** $P<0.001$. (E) Western blot analysis of PARG levels in the cell extracts used to measure PARG activity showing no significant reduction in the PARP-2^{KD} cells compared to the Control cells whilst HeLa PARG^{KD} cells showed significantly lower levels.

Figure 4 Recruitment of GFP-PARP-2 in HeLa Control and PARP-1^{KD} cells to laser damage sites (A) Representative images of the recruitment of fluorescent tagged PARP-2 to DNA damage sites in Control or PARP-1^{KD} cells treated with or without the PARP inhibitor ANI. Scale bar: 5 μm. (B) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of GFP-PARP-2 of these recruitment profiles in Control cells (closed squares), Control cells + ANI (open squares), PARP-1^{KD} cells (closed rhombi) and PARP-1^{KD} cells + ANI (open rhombi). Data represents mean relative spot intensity ± SEM, *n=10-16* individual cells from two independent experiments.

Figure 5 Recruitment of GFP-PCNA in HeLa Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells to laser damage sites (A) Representative images of the recruitment of fluorescent tagged PCNA to DNA damage sites in Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells. Scale bar: 5 μm. (B) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of GFP-PARP-2 of these recruitment profiles in Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells (closed circles, rhombi and squares). Data represents mean relative spot intensity ± SEM, *n=16-18* individual cells from two independent experiments.

Figure 6 Alkaline elution analysis of the kinetics of SSB rejoining and clonogenic radiation cell survival of PARP-2 depleted HeLa cells (A) The kinetics of SSB rejoining is given as the % of DNA retained on the filter with time in Control, PARP-1KD and PARP-2KD cells treated with (open circles, rhombi and squares) or without (closed circles, rhombi and squares) the PARP inhibitor ANI, showing that in the absence of PARP-2 SSB rejoining occurs as rapidly as in Control cells (B) Clonogenic cell survival of Control (closed circles) and PARP-2^{KD} (closed

For Peer Review

squares) cells after exposure increasing doses of IR showing no significant differences between the two cell lines. Data represents mean ± SD, for at least two independent experiments in triplicate.

For Peer Review

Nucleic Acids Research

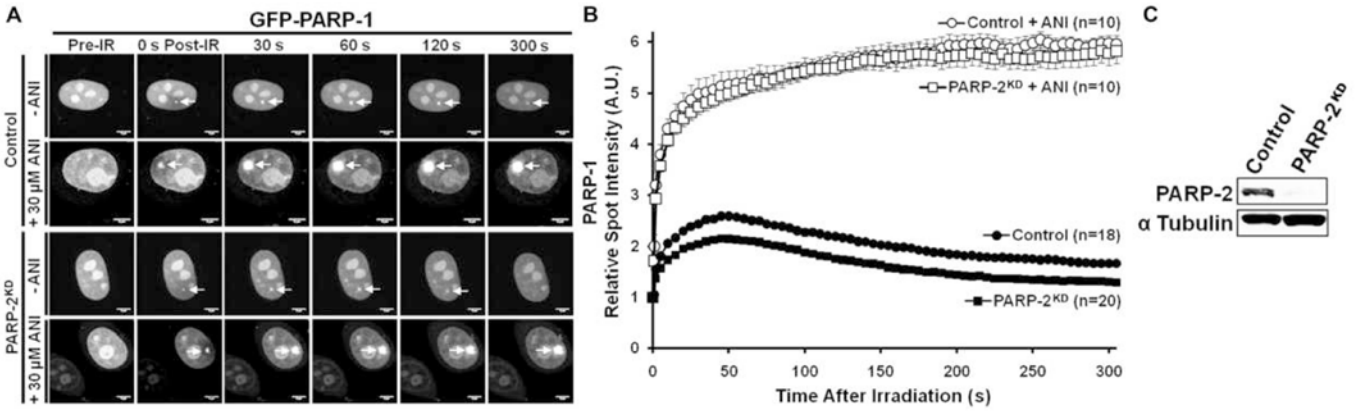


Figure 1 : Recruitment of PARP-1 in HeLa Control and PARP-2KD cells to laser damage sites (A) Representative images of the recruitment of fluorescent tagged PARP-1 to DNA damage sites in Control or PARP-2KD cells treated with or without the PARP inhibitor ANI. Scale bar: 5 μm (B) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of GFP-PARP-1 of these recruitment profiles in Control cells (closed circles), Control cells + ANI (open circles), PARP-2^{KD} cells (closed squares) and PARP-2^{KD} cells + ANI (open squares). Data represents mean relative spot intensity ± SEM, n=10-20 individual cells from two independent experiments, (C) Western blot analysis confirming stable depletion of PARP-2 in PARP-2^{KD} cells.

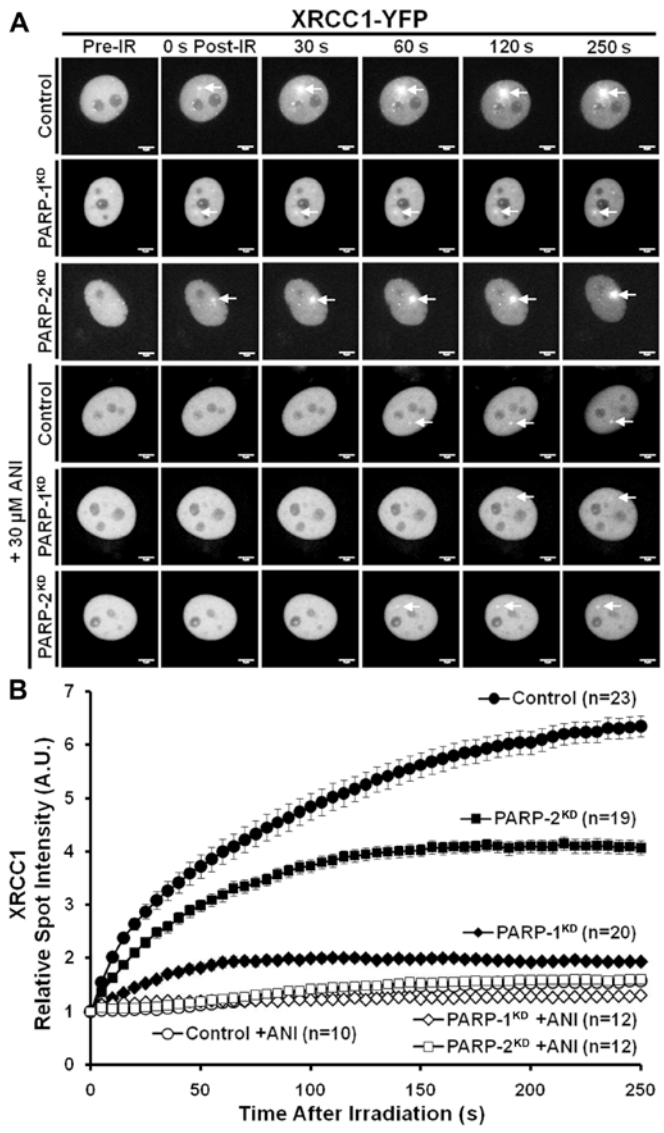


Figure 2 : Recruitment of XRCC1 in HeLa Control, PARP-1KD and PARP-2^{KD} cells to laser damage sites (A) Representative images of the recruitment of fluorescent tagged XRCC1 to DNA damage sites in Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells treated with or without the PARP inhibitor ANI. Scale bar: 5 μm (B) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of XRCC1-YFP of these recruitment profiles in Control, PARP-1KD and PARP-2KD cells (closed circles, rhombi and squares) and Control, PARP-1KD and PARP-2KD cells + ANI (open circles, rhombi and squares). Data represents mean relative spot intensity ± SEM, *n=12-23* individual cells from two independent experiments.

Nucleic Acids Research

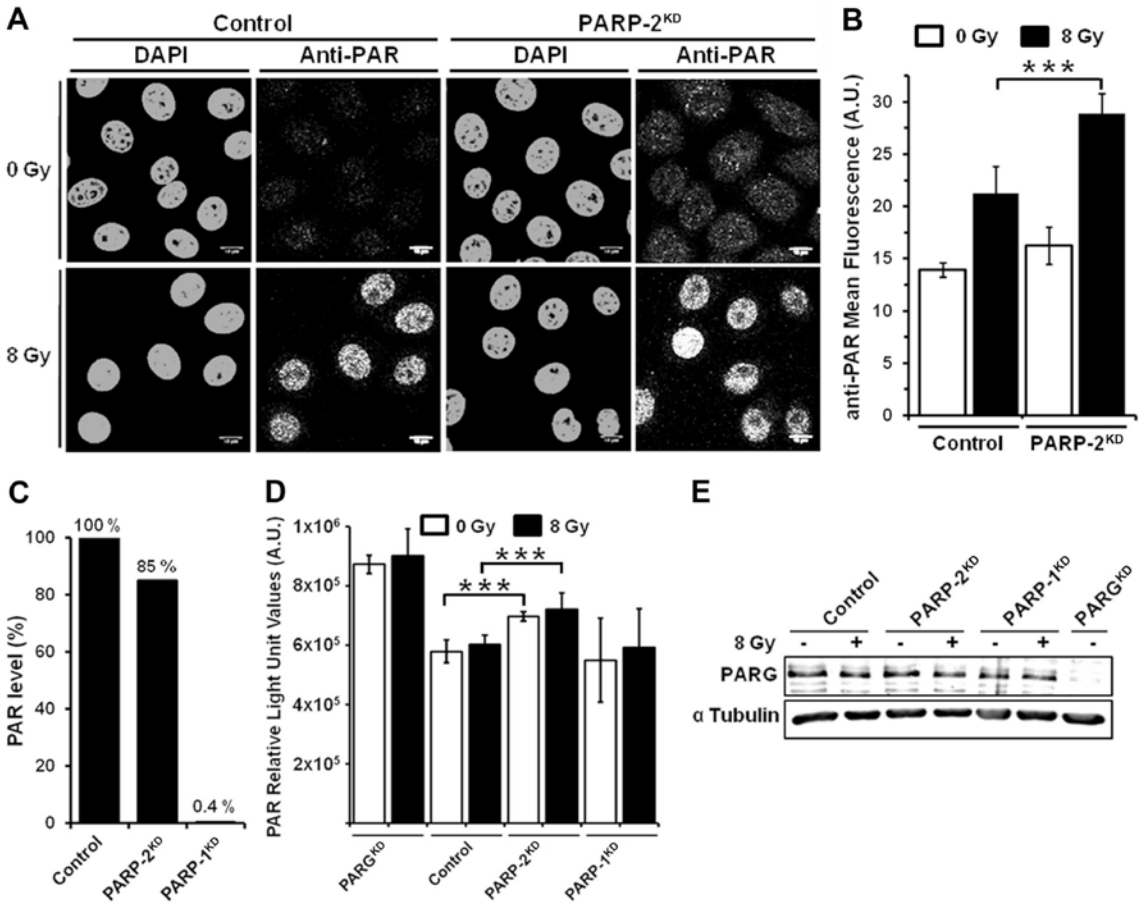


Figure 3 : Modulation of PAR levels and PARG activity in HeLa PARP-2^{KD} cells (A) Representative images of PAR immunofluorescence in Control cells or PARP-2^{KD} cells before and after exposure to 8 Gy of IR (a, zooming set to 4) Scale bar: 10 µm. (B) Quantification of the PAR staining. Data represents the mean ± SD based on the fluorescence intensity in 500 cells/treatment group in two independent experiments *** P<10-5. (C) PARP activity in permeabilised cells expressed as a % of the Control cells in two independent experiments (D) PARG activity in PARP-2^{KD} cells. The Relative Light Unit (RLU) values correspond to the amount of PAR polymer that has not been hydrolysed during a 30 min incubation with a protein extract prepared from untreated or cells treated with 8Gy IR. Data are mean ± SD for two independent experiments in triplicate and show that in PARP-2^{KD} cells PARG activity is reduced *** P<0.001. (E) Western blot analysis of PARG levels in the cell extracts used to measure PARG activity showing no significant reduction in the PARP-2^{KD} cells compared to the Control cells whilst HeLa PARG^{KD} cells showed significantly lower levels.

Nucleic Acids Research

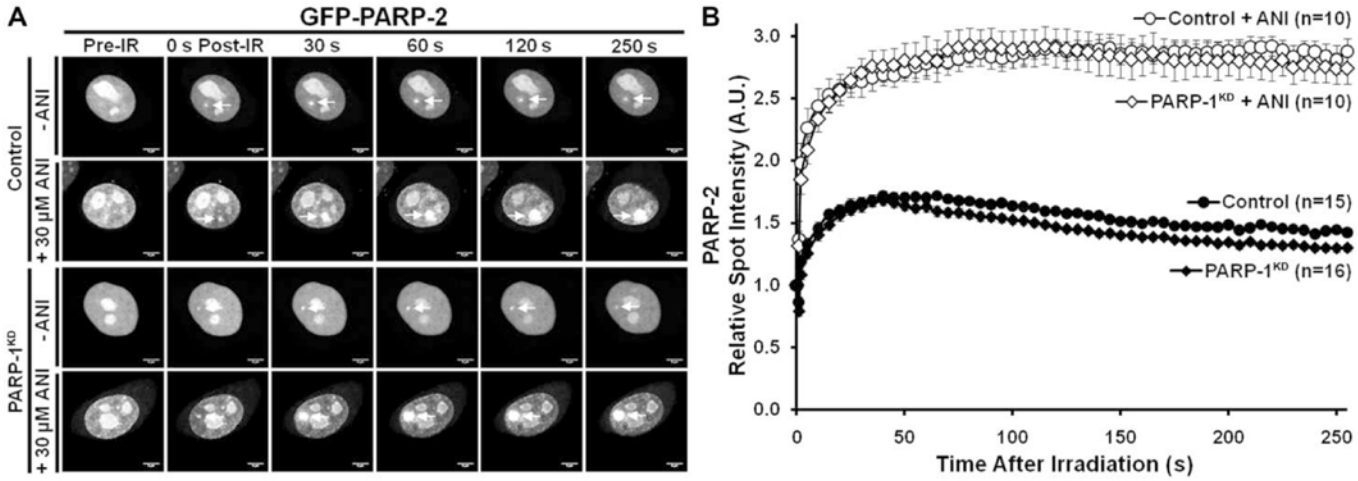


Figure 4 : Recruitment of GFP-PARP-2 in HeLa Control and PARP-1^{KD} cells to laser damage sites (A) Representative images of the recruitment of fluorescent tagged PARP-2 to DNA damage sites in Control or PARP-1^{KD} cells treated with or without the PARP inhibitor ANI. Scale bar: 5 µm. (B) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of GFP-PARP-2 of these recruitment profiles in Control cells (closed squares), Control cells + ANI (open squares), PARP-1^{KD} cells (closed rhombi) and PARP-1^{KD} cells + ANI (open rhombi). Data represents mean relative spot intensity ± SEM, *n=10-16* individual cells from two independent experiments.

Nucleic Acids Research

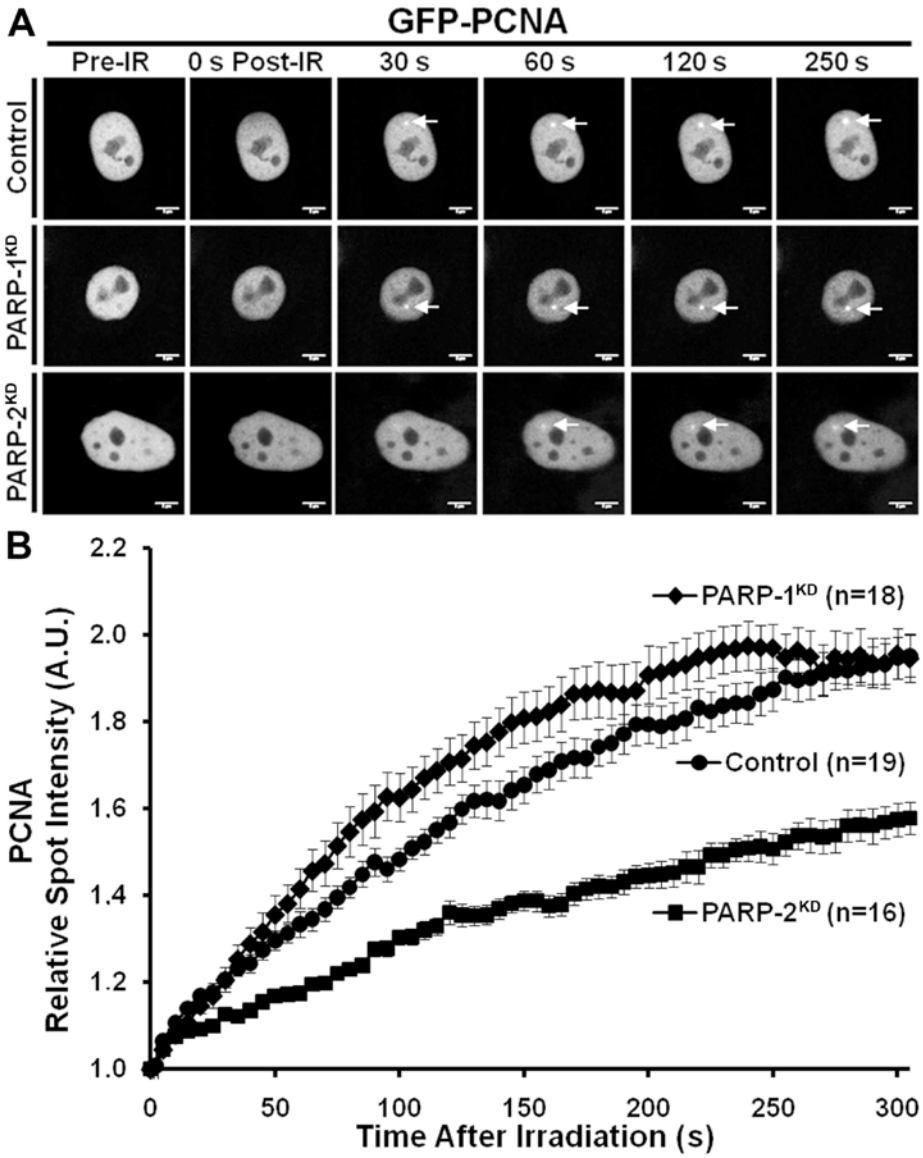


Figure 5 : Recruitment of GFP-PCNA in HeLa Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells to laser damage sites (A) Representative images of the recruitment of fluorescent tagged PCNA to DNA damage sites in Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells. Scale bar: 5 μm. (B) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of GFPPARP-2 of these recruitment profiles in Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells (closed circles, rhombi and squares). Data represents mean relative spot intensity ± SEM, *n=16-18* individual cells from two independent experiments.

Nucleic Acids Research

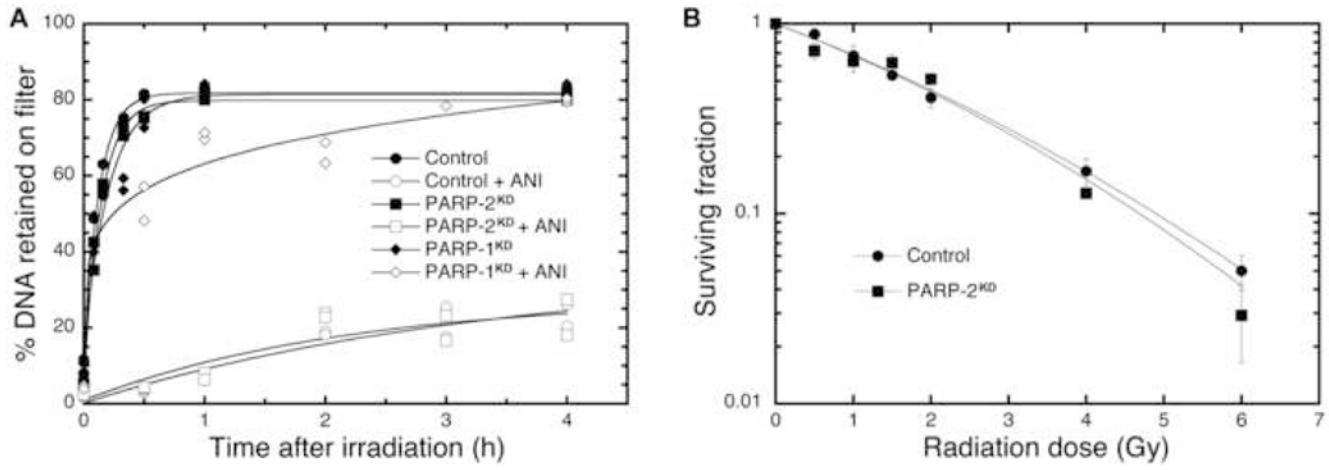
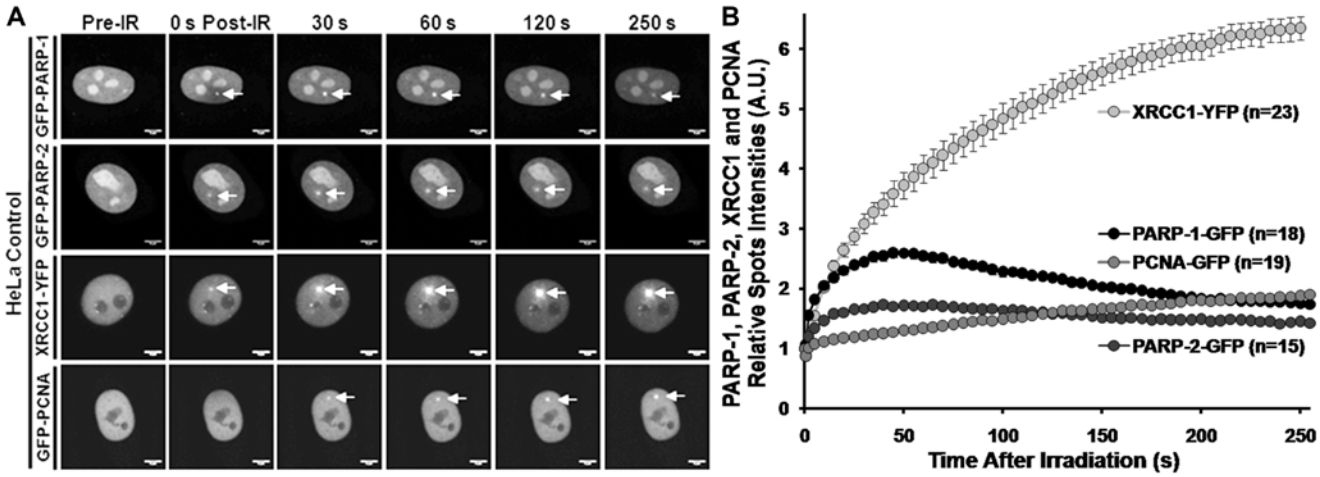


Figure 6 : Alkaline elution analysis of the kinetics of SSB rejoining and clonogenic radiation cell survival of PARP-2 depleted HeLa cells (A) The kinetics of SSB rejoining is given as the % of DNA retained on the filter with time in Control, PARP-1^{KD} and PARP-2^{KD} cells treated with (open circles, rhombi and squares) or without (closed circles, rhombi and squares) the PARP inhibitor ANI, showing that in the absence of PARP-2 SSB rejoining occurs as rapidly as in Control cells (B) Clonogenic cell survival of Control (closed circles) and PARP-2^{KD} (closed squares) cells after exposure increasing doses of IR showing no significant differences between the two cell lines. Data represents mean ± SD, for at least two independent experiments in triplicate.

Nucleic Acids Research



Supplemental Fig. 1 Recruitment of BER proteins to laser damage sites in Control cells (a) Representative images of the recruitment of fluorescent tagged PARP-1, PARP-2, XRCC1 and PCNA to DNA damage sites in Control cells. Scale bar: 5 μm. (b) Quantitative analysis of the relative spot intensity with time of these recruitment profiles for each protein. Data represents mean relative spot intensity ± SEM, *n=15-23* individual cells from two independent experiments.

2. Résultats complémentaires

Dans le but d'éclaircir le rôle de PARP-2 dans le SPR et LPR, et de mettre en évidence l'importance de son activité en absence de PARP-1 dans la réponse aux radiations ionisantes nous avons entrepris de :

- comparer l'effet de la déplétion de PARP-2 à celui de la déplétion de la Ligase I ou de PARP-1 sur la radiosensibilité des cellules. Nous avons choisi la Ligase I parce qu'il a été montré que son recrutement au site du dommage dépend de PCNA (364) elle-même régulée par PARP-2 (Article n° 2).

- vérifier si l'inhibition de l'activité des PARPs a des conséquences différentes sur la radiosensibilité des cellules Contrôles, PARP-1^{KD}, PARP-2^{KD} ou Ligase I^{KD}.

- étudier les cinétiques de recrutement de la Ligase I au site du dommage de l'ADN dans les cellules PARP-2^{KD} et PARP-1^{KD} (Travaux actuellement en cours).

2.1. Radiosensibilité des cellules HeLa Contrôles, PARP-1KD, PARP-2KD et Ligase-IKD

La survie au rayonnement des cellules HeLa Contrôles, PARP-1^{KD}, PARP-2^{KD} (présentées dans le papier n°1) et Ligase I^{KD} a été déterminée en utilisant le test clonogénique.

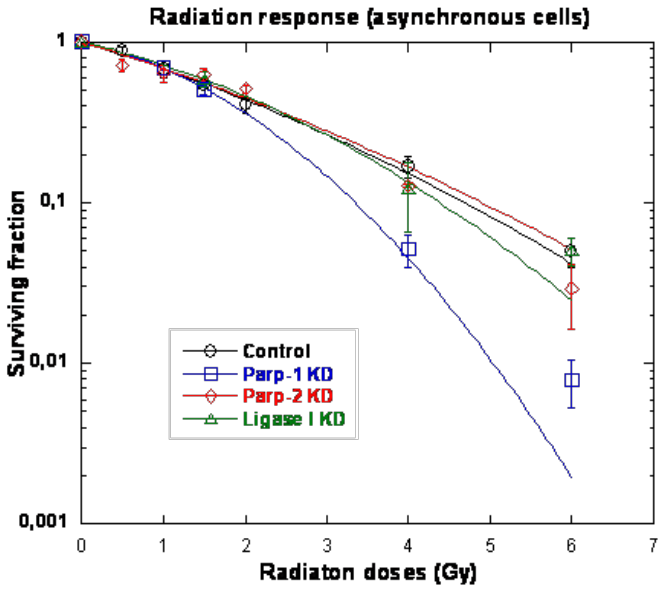


Figure 24 : Radiosensibilité des cellules HeLa Contrôles, PARP-1^{KD}, PARP-2^{KD} et Ligase-I^{KD}. Les lignées cellulaires Contrôles, PARP-1^{KD}, PARP-2^{KD} et Ligase I^{KD} ont été ensemencées respectivement à 1 x 10^3, 2 x 10^3, 1 x 10^3, 1.5 x 10^3 cellules dans des flacons de 25 cm^2. Après trois à cinq heures d'incubation pour permettre aux cellules d'adhérer, les flacons sont exposés à des doses croissantes (0 à 6 Gy) de rayons γ puis ré -incubés et laissés pousser en colonies pendant 12 (Contrôles et PARP-2^{KD}), 13 (Ligase I^{KD}) ou 15 jours (PARP-

1^{KD}) avant fixation, coloration et comptage. Ces expériences ont été faites au minimum deux fois en triplicat. Valeurs = Moyennes, Barres d'erreurs = Déviation standard.

Les résultats obtenus après comptage des colonies montrent une hyper-radiosensibilité des cellules PARP-1^{KD} par rapport aux Contrôles. Ce résultat obtenu avec des cellules non synchronisées (essentiellement en phase G1) est parfaitement en accord avec les résultats de Godon et al. (179) utilisant des cellules synchronisées en phase S. Cependant, les cellules Ligase I^{KD} comme les PARP-2^{KD} ne montrent aucune différence en termes de réponse aux rayonnements en comparant avec les cellules Contrôles.

2.2. Effet de l'inhibition de PARPs sur la radiosensibilité des cellules HeLa Contrôles, PARP-1^{KD}, PARP-2^{KD} et Ligase-1^{KD}

Le même test de survie clonogénique a été utilisé en absence ou en présence d'un inhibiteur de PARPs (ANI) pendant 1 ou 24 h.

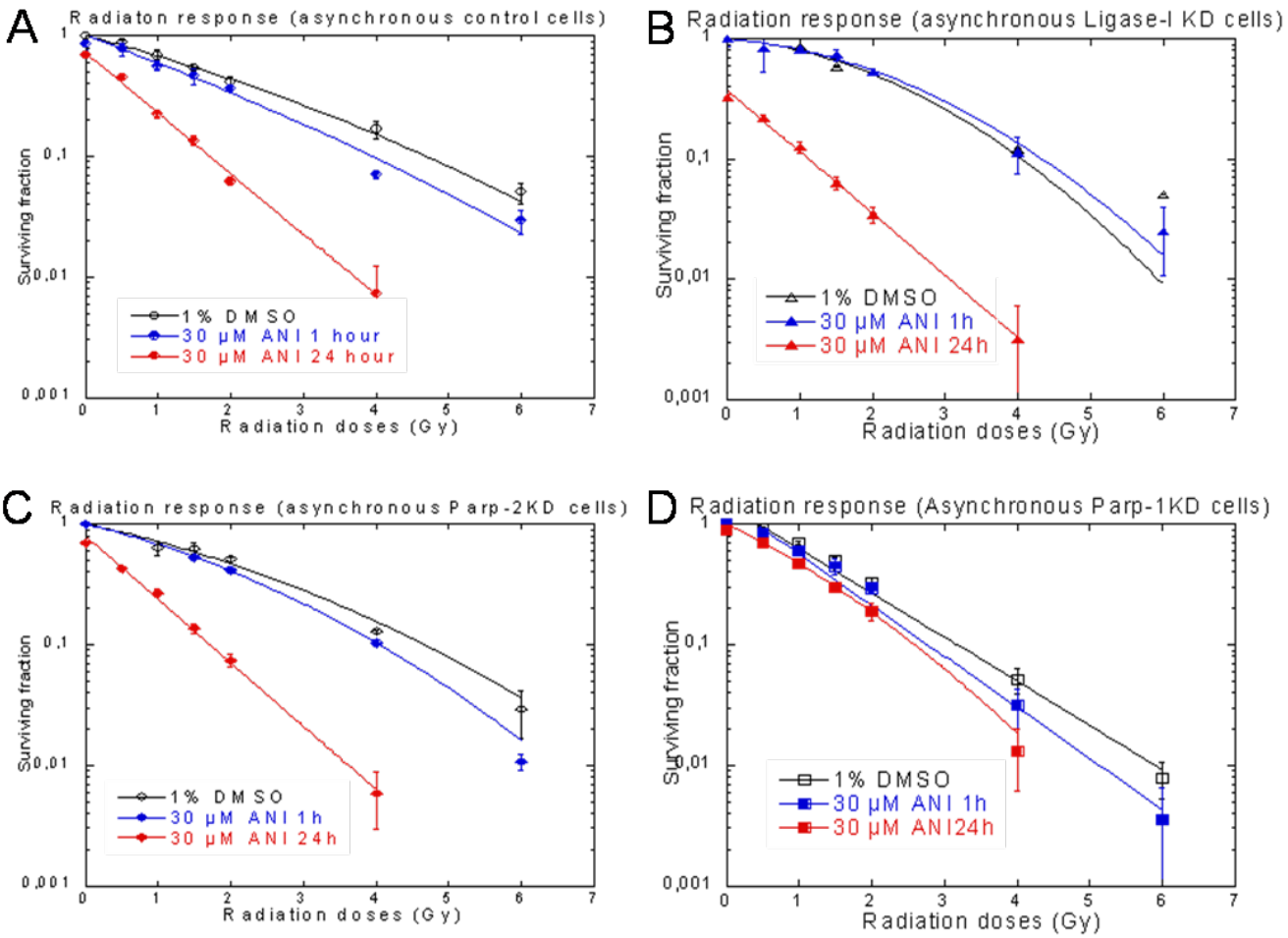


Figure 25 : Radiosensibilité des cellules HeLa Contrôles (A), Ligase I^{KD}(B), PARP-2^{KD}(C) et PARP-1^{KD} (D) en absence ou en présence d'inhibiteur de PARP. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour la figure 24 à l'exception de l'ANI dilué dans le

DMSO à 30 µM, ajouté 30 min avant irradiation puis enlevé 30 min ou 23h et 30min après irradiation.

La présence d'ANI dans les cellules non-synchronisées pendant 1 h semble avoir un effet négligeable sur la survie des différentes lignées soit avant (0 Gy) soit après irradiation (1- 4 Gy). Contrairement à sa présence pendant seulement 1h, l'ANI après 24 h rend les cellules Contrôles, PARP-2^{KD} et Ligase I^{KD} fortement radiosensibles. Ceci peut-être expliqué par le blocage de la PARP-1 aux sites des dommages (Article n° 2 – Figure 1, 4 et 6 a) générant au niveau des fourches de réplication des CDBs létales (179).

Malgré leur hyper-radiosensibilité les cellules PARP-1^{KD} semble aussi subir encore un effet sensibilisateur d'ANI (Figure 25 D). Cette légère sensibilité constaté à 0,5 Gy ($P< 0,004$), 1 Gy ($P< 0,004$), 1,5 Gy ($P< 0,029$), 2 Gy ($P< 0,029$) et 4 Gy ($P< 0,011$) est confirmée par le test statistique de Kruskal-Wallis en comparant les moyennes des nombres de colonies. Cet effet qui est à la limite du significatif, de l'ANI sur les cellules PARP-1^{KD} pourrait être dû à l'inhibition de l'activité de PARP-2. Ceci suggère qu'en absence de PARP-1 l'activité de PARP-2 est nécessaire pour la survie des cellules. Ce résultats avec celui où nous montrons que la déplétion de PARP-2 n'affecte pas la survie des cellules HeLa (Figure 6 b article n°2) nous suggèrent que la déplétion de PARP-2 n'a pas les conséquences que son inhibition. Affin de pouvoir vérifier cette hypothèse il est nécessaire de comparer l'effet de la déplétion de PARP-2 et de son inhibition en utilisant des inhibiteurs très spécifiques pour PARP-2.

La sensibilité des cellules Ligase I^{KD} en présence d'ANI pendant 24 h sans les irradier (point 0 Gy, Figure 25 B) suggère une létalité synthétique due au double ciblage de PARP-1 (par inhibition) et de la Ligase I (par déplétion). En comparant avec la lignée Contrôle, les résultats obtenus avec les cellules Ligase I^{KD} après irradiation en présence d'ANI pendant 24 h (0,218 ± 0,014 de survie au lieu de 0,452 ± 0,012 à 0,5 Gy, 0,125 ± 0,013 au lieu de 0,225 ± 0,016 à 1 Gy, 0,062 ± 0,007 au lieu de 0,135 ± 0,011 à 1,5 Gy, 0,034 ± 0,005 au lieu de 0,062 ± 0,002 à 2 Gy et 0,003 ± 0,002 au lieu de 0,007 ± 0,002 à 4 Gy)-montrent que la déplétion de la Ligase I augmente l'effet radio-sensibilisateur de l'ANI (Figure 25 A et B). Ce résultat montre l'importance de la Ligase I, en cas d'inhibition des PARPs, pour la réponse cellulaire aux RI es est en faveur de l'hypothèse de la létalité synthétique entre PARP-1 et Ligase I.

2.3. Impact de l'inhibition des PARPs et de la déplétion de la Ligase I sur le SSBR

Dans l'article ci-dessus nous avons montré par élution alcaline que l'inhibition des PARPs empêche la réparation complète des CSBs (Figure 6 a – Article n° 2) ce qui pourrait

expliquer par génération des CDBs en phase S la radiosensibilité des cellules Contrôles et PARP-2^{KD} en présence de l'ANI pendant 24 h (Figure 25). Cette fois ci afin de montrer s'il y a une déficience dans le SSBR qui pourrait expliquer l'augmentation d'effet radio-sensibilisateur d'ANI dans les cellules Ligase I^{KD} (Figure 25) nous avons effectué la même expérience d'élution alcaline que celle de la figure 6 a (Article n° 2) avec des cellules Ligase I^{KD} en présence d'ANI. Cette expérience nous a permis de vérifier si l'inhibition des PARPs en absence de la Ligase I diminue la vitesse de réparation des CSBs plus qu'en sa présence, ce qui pourrait rendre explication à l'augmentation du pouvoir radio-sensibilisateur d'ANI en absence de Ligase I.

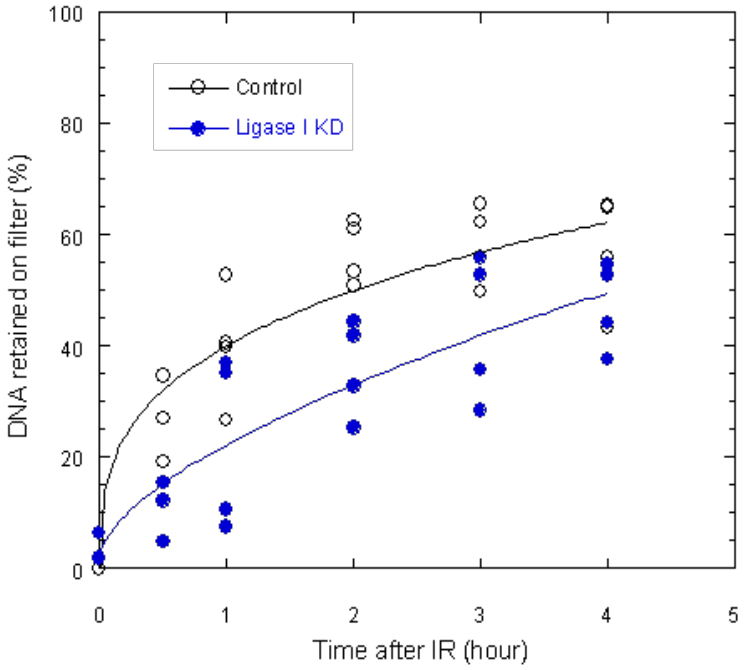


Figure 26 : Cinétiques de ligation des CSBs d'ADN en présence d'ANI dans des cellules Ligase I^{KD}. Les résultats sont obtenus d'une seule expérience faite en dupliqua.

En effet, les résultats préliminaires d'élution alcaline (Figure 26) montrent que les cellules Ligase I^{KD} réparent les CSBs moins vite que les cellules Contrôles, et que 4 h encore après irradiation moins de CSBs sont réparés. Ce résultat montre qu'un défaut dans la réparation des CSBs pourrait être donc à l'origine d'augmentation d'effet radio-sensibilisateur d'ANI.

Le blocage du SPR, par inhibition de PARP-1 et PARP-2, et du LPR par déplétion de Ligase I devrait théoriquement empêcher à 100 % la réparation sauf qu'après 4 h nous avons quand même environ 50 % de CSBs réparées. Ceci supporte l'hypothèse de l'existence d'une autre Ligase qui pourrait compenser l'absence de Ligase I et qui est fort probablement la Ligase III (33).

III. Discussion - Conclusions

Le métabolisme de poly(ADP-ribose)ylation est une modification post-traductionnelle de différentes protéines impliquées dans plusieurs processus cellulaires incluant la réparation des dommages d'ADN. Ce métabolisme est principalement régulé par une balance d'activités de PARP-1, PARP-2 et PARG. Ces protéines sont les clés de la signalisation des dommages d'ADN dans le BER et le SSBR, voies de réparation des dommages de bases et des CSBs. Contrairement a PARP-1 et PARG, peu est connu sur la contribution, in vivo, de PARP-2 dans la PARylation en réponse des cellules humaine aux dommages d'ADN et sur son rôle exact dans le BER et le SSBR.

Dans cette 2ème partie de mon travail nous avons pu confirmer l'implication de PARP-2 dans le SPR et montrer pour la première fois son implication dans le LPR. Nous avons découvert la nécessité de PARP-2 pour le recrutement maximal de PARP-1 et XRCC1, facteurs du SPR, et de PCNA, protéine clé du LPR, au site du photo-dommage d'ADN. La régulation du recrutement de PARP-1 par PARP-2 peut être expliquée par la contribution de cette dernière dans la régulation d'activité de PARG en réponse aux dommages. En effet la déplétion de PARP-2 cause une petite diminution d'activité totale des PARPs dans les extraits cellulaires. Cette petite diminution d'activité PARP est au même temps accompagnée d'une diminution d'activité PARG après induction des dommages par RI et d'un niveau plus élevé des PARs dans les cellules PARP-2^{KD} que dans les cellules Contrôles. Par conséquence, il est fort possible que PARP-1 acquière par auto-modification plus de polymères diminuant son recrutement par plus de répulsions entre les charges négatives de polymères et d'ADN (figure 27). En ce qui concerne XRCC1, étant donné qu'elle interagit avec PARP-2 aussi (451) la diminution de son recrutement peut être due à l'absence de PARP-2 elle-même et non seulement la conséquence de la diminution de recrutement de PARP-1.

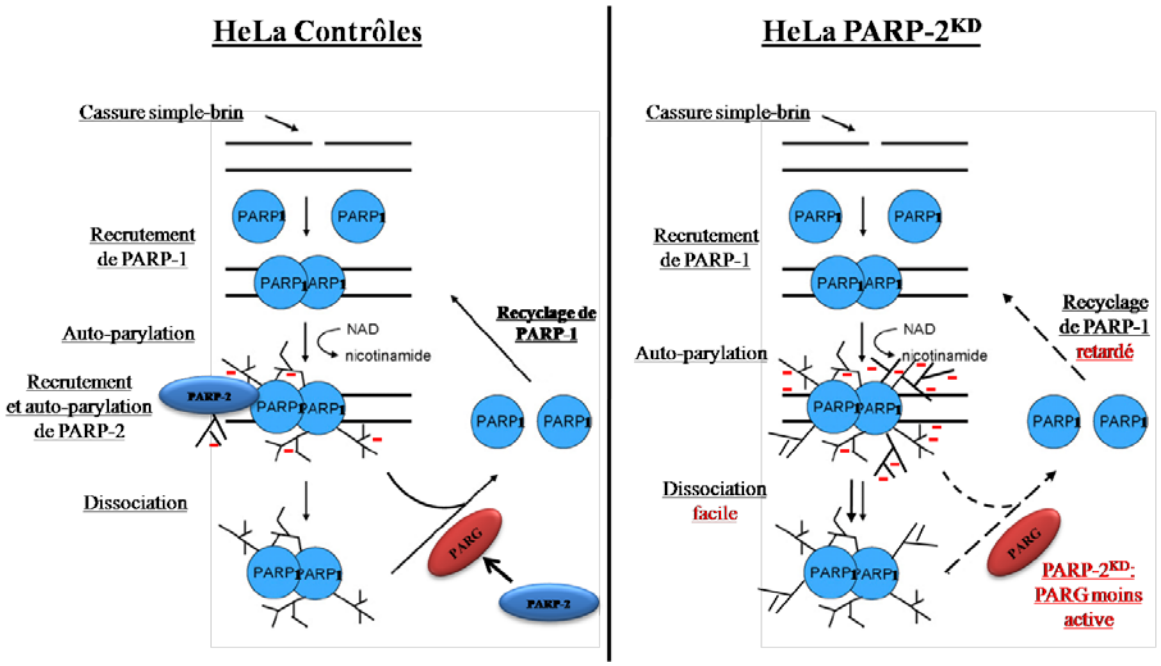


Figure 27 : Scémas représentatifs de régulation de recrutement et de dissociation de PARP-1 du site d'une cassure simple-brin, dans des cellules HeLa, en présence (à gauche) ou en absence (à droite) de PARP-2.

La question qui se pose maintenant est : comment PARP-2 peut moduler l'activité PARG ? Il y a deux hypothèses qui pourront répondre à cette question. La première est une régulation par poly(ADP-ribose)ylation. Cependant, nous avons montré que la déplétion de PARP-1 n'affecte pas l'activité PARG ce qui laisse se demander si les polymères synthétisés par PARP-2 ont des caractéristiques qui les diffèrent de ceux synthétisés par PARP-1 permettant seulement à PARP-2 de modulé l'activité de PARG. Fahrer et al. ont (145) montré que la liaison PAR-protéine peut dépondre de la longueur de la chaine polymérique, mais il est inconnu si PARP-2 synthétise des chaines polymériques plus ou mois longues que celles synthétisées par PARP-1. La deuxième hypothèse est que PARP-2 pourrait réguler l'activité PARG via une interaction directe entre les deux protéines.

Afin d'analyser avec plus de détail le mode de régulation des processus de recrutement et de dissociation des protéines étudiées en espace corpo-temporel nous avons analysé la croissance d'intensité de fluorescence I(t) des focis en utilisant l'équation mono-exponentielle suivante :

$$I(t) = m1 + m2*exp[1 - exp(-m3*x)]$$

Où : x est le temps, m1 est l'intensité au temps zéro, m2 est l'amplitude de la variation de fluorescence présentant l'affinité de la protéine au site du dommage, et (m1+m2) = Imax est

l'intensité au temps infini présentant le plateau de la courbe, et m3 est la constante de vitesse de la réaction de diffusion de la protéine.

Cette analyse nous a permis de montrer que le recrutement de XRCC1 est un processus contrôlé principalement par diffusion. En effet, la présence d'ANI réduit l'affinité (m2) de XRCC1 dans les cellules Contrôles (0.858 ± 0.010 au lieu de 5.088 ± 0.027) mais ne modifie pas significativement la valeur de la pente (m3) (0.0107 ± 0.0004 au lieu de 0.0096 ± 0.0002 s-1). C'est ce qu'on attend d'un processus contrôlé par diffusion. Autrement l'ANI ne modifie que la capacité à lier XRCC1 au site du dommage. En revanche, en absence d'ANI la constante de vitesse de diffusion de XRCC1 (m3) est significativement plus élevée dans les cellules PARP-2^{KD} (m3 = 0.0197 ± 0.0003 s-1) et surtout les PARP-1^{KD} (m3 = 0.0429 ± 0.0022 s-1) que dans les cellules Contrôles (m3 = 0.0096 ± 0.0001), alors que l'affinité exprimée par le paramètre m2 est significativement (cellules PARP-2^{KD}, m2 = 3.0972 ± 0.0293) ou très significativement (cellules PARP-1 ^{KD}, m2 = 1.186 ± 0.0544) diminuée par rapport au Contrôle (m2 = 5.0879 ± 0.0275). Ceci indique que la diffusion de XRCC1 vers et depuis les formes ADP-ribosylées de PARP-1 (lignée PARP-2^{KD}) et plus encore PARP-2 (lignée PARP-1^{KD}) est facilitée, ce qui suggère des changements significatifs de la viscosité du milieu autour du dommage d'ADN. Ceci indique d'importants remaniements dans la structure chromatinienne au moment de la réponse aux dommages d'ADN, à cause de la déplétion de PARP-1 ou PARP-2.

En parallèle, nous avons pu tester l'effet d'inhibition de la poly(ADP-ribose)ylation sur le recrutement de PARP-1 et PARP-2 aux sites des dommages. Les cinétiques obtenues en présence d'ANI montrent une accumulation des deux protéines au site du dommage. Ces résultats ne sont pas en accord avec la même étude de Mortusewicz et al. (362) en utilisant l'inhibiteur de PARP NU1025. Cette différence est peut être due à une différence des degrés de spécificité d'ANI et du NU1025. Afin de vérifier cette hypothèse de spécificité des inhibiteurs nous envisageons de faire les mêmes études de recrutement avec l'inhibiteur ABT-888. D'autre part, la persistance de GFP-PARP-1 et GFP-PARP-2 après accumulation au site du dommage en présence d'ANI confirme l'importance de l'activité PARP pour la dissociation de PARP-1 et PARP-2 du site du dommage.

Malgré que la déplétion de PARP-2 diminue le recrutement de PARP-1, XRCC1 et PCNA, les résultats d'élution alcaline montrent que ces diminutions ne sont pas suffisantes au point d'avoir d'effets importants sur les cinétiques du SSBR ni sur la radiosensibilité des cellules. Cependant, l'inhibition de PARP-2 dans les cellules PAPR-1^{KD}, dans lesquelles le

SPR et défectif (179), diminue la vitesse de réparation des CSBs (Article n°2 figure 6 a) ce qui pourrait expliquer la légère augmentation de la radiosensibilité des cellules PARP-1^{KD} en présence d'ANI (Figure 25 D, ANI 24h). Il est possible que la diminution de la vitesse de réparation dans les cellules PARP-1^{KD} traitées avec l'ANI soit due à un compromis du LPR suite à l'inhibition de PARP-2, toutefois, nous n'excluons pas un éventuelle blocage du SSBR à cause de l'accumulation de PARP-2 au site du dommage. Nous avons pensé à une possible implication de PARP-3 cependant celle ci est absente des cellules HeLa.

En conclusion, cette étude révèle qu'en réponse aux dommages d'ADN, PARP-2 joue un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme de la poly(ADP-ribose)ylation via deux modes d'action : la synthèse des polymères et la régulation d'activité PARG. Cette découverte avec celle qui montre que PARG interagit avec PCNA et probablement régule le LPR (363) suggèrent qu'en plus de son participation dans le SPR et le LPR PARP-2 peut être impliquée aussi dans cette régulation. En même temps PARP-2 semble, comme PARP-1, impliquée dans le remodelage de la structure chromatinienne en réponse aux dommages d'ADN.

3ème partie : L'impact d'inhibition d'activité PARP et de déplétion de PARP-1, PARP-2, PARG ou Cdk5 sur les cinétiques de recrutement des facteurs de remodelage de la chromatine ALC1 et CAF1 au site du photo-dommage

I. Introduction

En utilisant des cellules synchronisées en phase S du cycle cellulaire Godon et al. avaient montré que les cellules dépourvues de PARP-1 sont hyper-radiosensibles et qu'elles sont, au même temps, capables de réparer de façon normale les CSBs (179). Les résultats de survie clonogénique obtenus dans la 2ème partie de mes travaux (Figure 24) en utilisant des cellules non synchronisées montrent aussi que la lignée HeLa déficiente pour PARP-1 est hyper-radiosensible. Or, paradoxalement, la cinétique de réparation normale des CSBs dans cette lignée non synchronisée (Article n°2 - Figure 6 a) montre que cette hyper-radiosensibilité ne peut s'expliquer par le seul rôle de PARP-1 dans la réparation des CSBs. Une explication possible de la radiosensibilité des cellules déficientes pour PARP-1 pourrait provenir d'une modification de la structure chromatinienne après exposition aux radiations ionisantes. En effet, PARP-1 poly-ADP-ribosyle les histones H1 et H2B (Introduction générale § IV.1.4) permettant la relaxation de la chromatine et facilite ainsi l'accès des protéines de la réparation. Les mécanismes par lesquels les PARs modulent la chromatine pendant la réparation ne sont pas encore élucidés et les contributions de PARP-2, de PARG et de Cdk5, qui ont tous un impact sur le niveau des PARs, n'y sont pas connues. Il y a 2 ans, un facteur de remodelage de la chromatine ALC 1 a été identifié comme étant ADP-ribosylé en réponse aux dommages de l'ADN (3). ALC1 est une enzyme de remodelage de la chromatine fortement activée par PARP-1 (Introduction générale § IV.1.4) (183). Un autre facteur chromatinien, la protéine CAF-1, semble également avoir un rôle majeur dans l'assemblage de la chromatine au moment de la réparation des dommages (412). Sa relation avec PARP-1 et PARP-2 reste inconnue.

L'objectif de mon travail est donc de déterminer, en utilisant le même modèle de cellules HeLa que j'ai utilisé dans les deux premières parties de ma thèse, quel est l'impact de la déficience de PARP-1 sur les cinétiques de recrutement des facteurs chromatinien, ALC1 et CAF1, ce qui pourrait apporté une explication aux phénomènes de radiosensibilité de la lignée PARP-1^{KD}. De plus, comme nos études ont montré que la déplétion de PARP-2, de PARG ou de Cdk5 peut moduler le niveau des PARs, nous avons décidé d'évaluer l'impact de leur déplétion sur les cinétiques de recrutement de ces deux facteurs chromatiniens.

Cette étude pourra aider à mettre en évidence le rôle capital du maintien de la structure chromatinienne en réponse aux radiations ionisantes, qui reste à ce jour un domaine de radiobiologie largement sous exploité.

La même méthodologie, de vidéo-microscopie et immunofluorescence couplée à l'induction du photo-dommages localisés, utilisée dans l'étude des cinétiques de recrutement des PARP-1, XRCC1 et PCNA dans les deux précédentes parties de mes travaux à été utilisée ici pour étudier les cinétiques de recrutement de :

- ALC1 dans les cellules Contrôles, PARP-1^{KD}, PARP-2^{KD}, $PARG^{KD}$ et $Cdk5^{KD}$.
- CAF-1 dans les cellules Contrôles et PARP-1^{KD}.

Les plasmides transfectés dans les cellules afin d'exprimer les deux protéines couplées aux fluorophores, ALC1-YFP et CAF-1-GFP, sont, respectivement, des précieux dons de S. Boulton (London Research Institute, UK) et de G. Almouzni (Institut Curie, Paris, France).

Les courbes des cinétiques de recrutement obtenues avec ALC1-YFP montrent que la déplétion de PARP-1, PARP-2 ou l'inhibition d'activité PARP ont différentes conséquences sur le recrutement et la dissociation d'ALC1. Cependant, les mêmes cinétiques sont observées dans les cellules PARP-2^{KD}, $PARG^{KD}$ et $Cdk5^{KD}$.

Des résultats, préliminaires, obtenus avec CAF-1-GFP montrent aussi que la déplétion de PARP-1 affecte le recrutement de CAF-1 au site du photo-dommage.

II. Résultats

1. L'impact d'inhibition de PARP ou de déplétion de PARP-1, PARP-2, PARG ou Cdk5 sur la cinétique de recrutement d'ALC1 au site du dommage d'ADN.

Comme attendu, le recrutement d'ALC1 au site du photo-dommage dans les cellules Contrôles était très rapide. Ce recrutement à fortement diminué en absence de PARP-1 (Figure 28 a), on observe une diminution d'approximativement, 80 % du recrutement d'ALC1 dans les cellules PARP-1^{KD} par rapport aux cellules Contrôles (Figure 28 b). Ces résultats sont parfaitement en accord avec ce qui a été publié en 2009 par Gottschalk *et al.* (183) en utilisant des cellules HeLa dépourvues de PARP-1 à l'aide des siRNA. L'ensemble de ces résultats confirme la nécessité de PARP-1 pour le recrutement et l'activité d'ALC1 au niveau du site du photo-dommage. Cependant, l'inhibition de l'activité PARP par l'ANI dans les cellules Contrôles et aussi les cellules PARP-1^{KD} empêche complètement le recrutement d'ALC1 suggérant la contribution d'autres PARPs dans l'induction de recrutement d'ALC1 au site du photo-dommage (Figure 28 a et b).

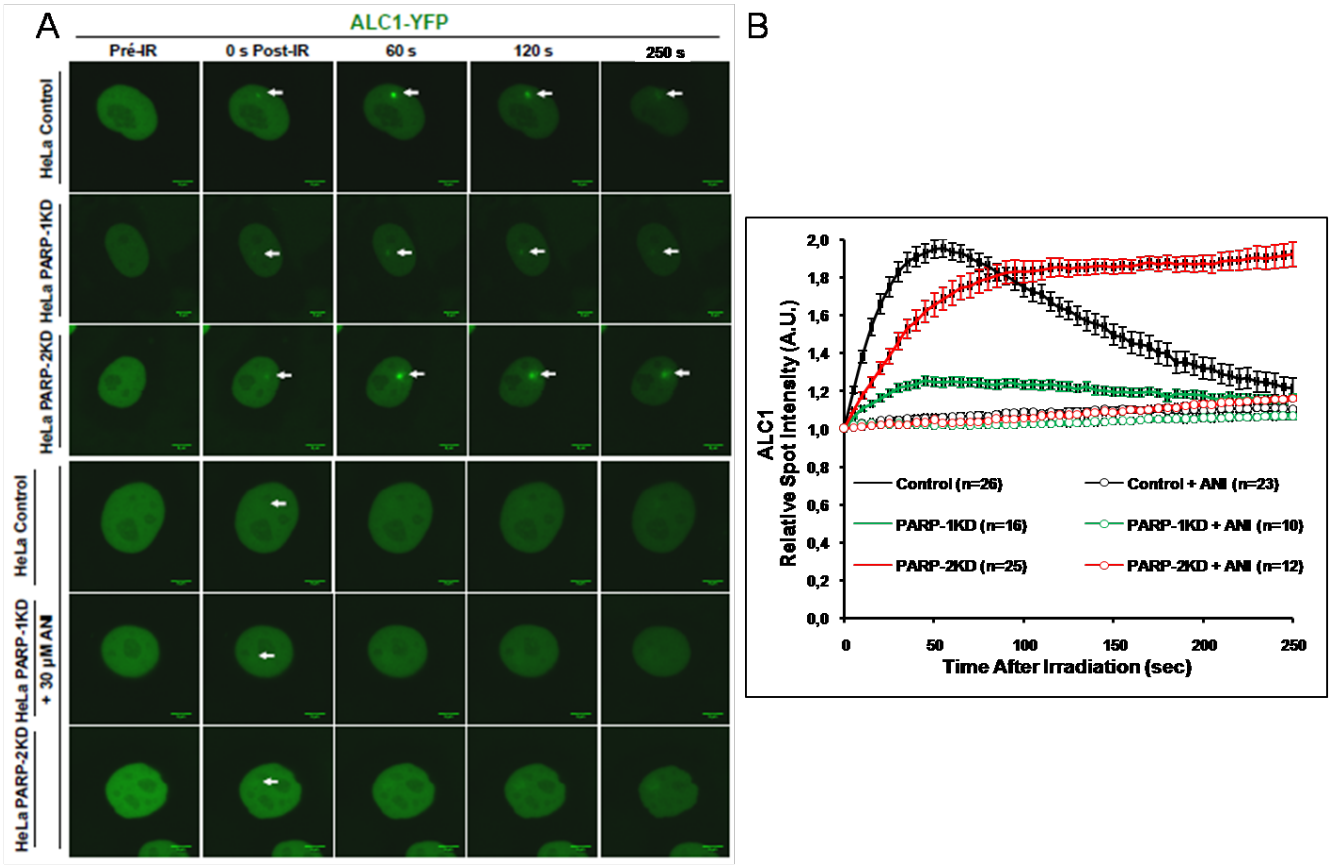


Figure 28: Recrutement d'ALC1 aux sites des dommages d'ADN dans des cellules HeLa Contrôles, PARP-1^{KD} et PARP-2^{KD}. (A) Des photos obtenues par vidéo-microscopie de cellules vivantes, micro-irradiées et exprimant ALC1-YFP. Barre = 5 µm. (B) Cinétiques de

recrutement d'ALC1-YFP, en fonction de temps, aux sites de micro-irradiations. Les valeurs représentent les moyennes des intensités de fluorescence des focis. Barres d'erreurs = SEMs. La même Macro développée dans ImageJ pour la mesure des intensités relatives des focis dans les papiers 1 et 2 a été utilisée. n = le nombre total des cellules examinées d'au moins 3 expériences.

PARP-2 est l'une des PARPs que nous soupçonnions d'êtres impliquées dans la régulation du recrutement et/ou de la dissociation d'ALC1. Effectivement, dans les cellules PARP-2^{KD} le recrutement d'ALC1 est retardé et n'atteint son maximum que 100 à 150 s après micro-irradiation au lieu de 50 s dans les cellules Contrôles (Figure 28 b). Etant donné que le recrutement d'ALC1 dépend de son interaction avec PARP-1 et aussi la formation des PARs (3,183), ce retard de recrutement pourrait être la conséquence de la diminution de la vitesse de formation des PARs due à l'absence de l'activité de PARP-2. Etonnamment et contrairement aux cellules Contrôles et PARP-1^{KD}, après 100-150s, ALC1 ne se dissocie pas et persiste au site du photo-dommage (Figure 28 a et b).

Dans la $2^{ème}$ partie de mes travaux nous avons montré qu'en absence de PARP-2 l'activité PARG est diminuée. Afin de comprendre le(s) processus par le(s)quel(s) PARP-2 agit sur le recrutement et la dissociation d'ALC1, nous avons vérifié l'effet de la déplétion de PARG sur le recrutement de ce facteur chromatinien.

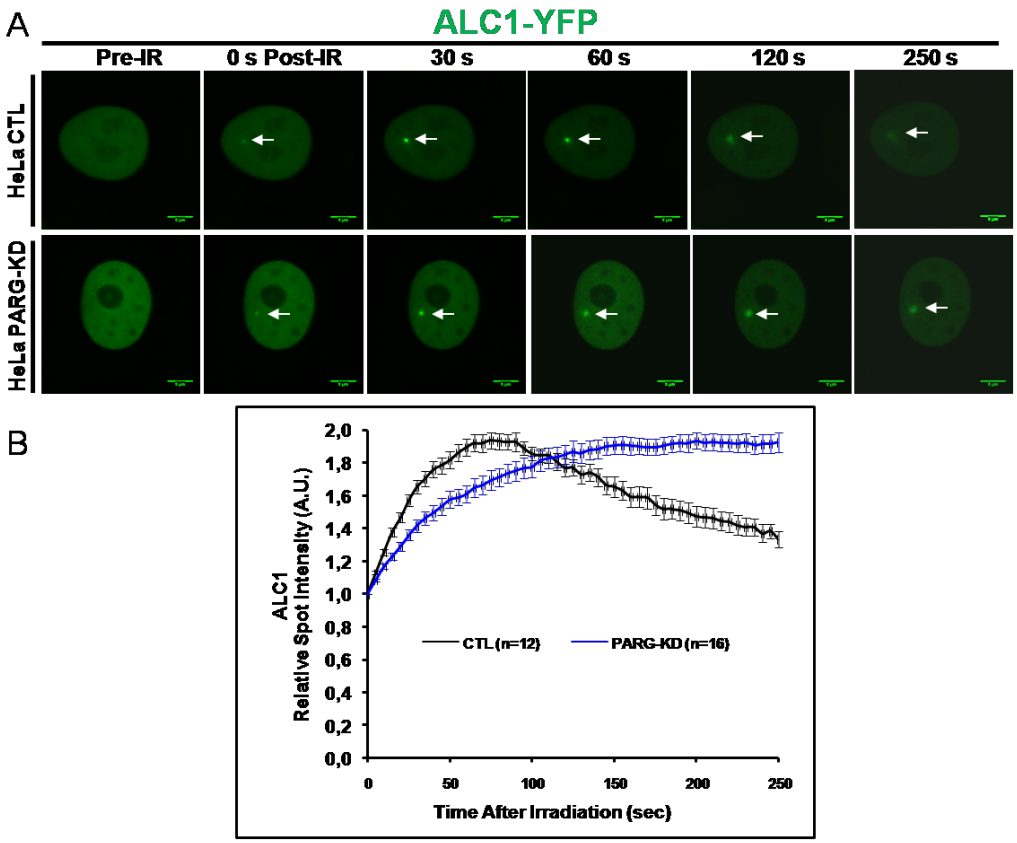


Figure 29 : Recrutement d'ALC1 aux sites des dommages d'ADN dans des cellules HeLa Contrôles et PARG^{KD}. (A) Des photos obtenues par vidéo-microscopie des cellules vivantes, micro-irradiées et exprimant ALC1-YFP. Barre = 5 µm. (B) Cinétiques de recrutement d'ALC1-YFP aux sites des micro-irradiations en fonction de temps. Les valeurs représentent les moyennes des intensités de fluorescence des focis. Barres d'erreurs = SEMs. La même Macro développée dans ImageJ pour la mesure des intensités relatives des focis dans les papiers 1 et 2 a été utilisée. n = le nombre total des cellules examinées de deux expériences.

Les résultats obtenus montrent que la déplétion de PARG affecte aussi le recrutement d'ALC1 au site du dommage. Les mêmes cinétiques de recrutement et de persistance observées dans les cellules PARP-2^{KD} se reproduisent dans les cellules PARG^{KD}.

Etant donné que nos résultats de la deuxième partie suggèrent que PARP-1 et PARP-2 sont toutes les deux impliquées dans la régulation du recrutement d'ALC1, je me suis également intéressé à vérifier l'éventuelle implication de Cdk5, qui régule l'activité de PARP-1 en réponse aux CSBs probablement par sa phosphorylation (Article n°1), dans cette régulation. En effet, un rôle de Cdk5 dans le remodelage de la chromatine en réponse aux dommages pourrait apporter une explication à l'hyper-radiosensibilité des cellules Cdk5^{KD} (Article n°1, Figure 1).

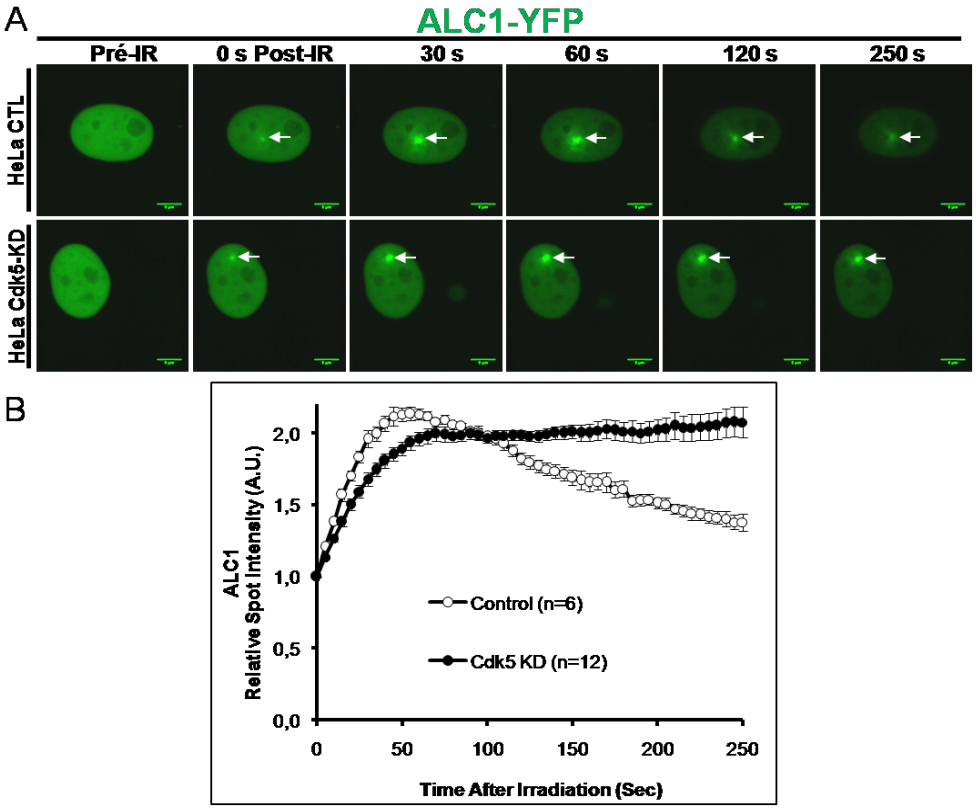


Figure 30 : Recrutement d'ALC1 aux sites des dommages d'ADN dans des cellules HeLa Contrôles et Cdk5^{KD}. (A) Des photos obtenues par vidéo-microscopie de cellules vivantes, micro-irradiées et exprimant ALC1-YFP. Barre = 5 µm. (B) Cinétiques de recrutement d'ALC1-YFP, en fonction de temps, aux sites des micro-irradiations. Les valeurs représentent les moyennes des intensités de fluorescence des focis. Barres d'erreurs = SEMs. La même Macro développée dans ImageJ pour la mesure des intensités relatives des focis dans les papiers 1 et 2 a été utilisée. Les résultats sont obtenus d'une seule expérience. n = nombre de cellules examinées.

Très remarquablement, les courbes des cinétiques de recrutement d'ALC1 au site du photo-dommage obtenues dans les cellules Cdk5^{KD} sont pratiquement identiques à celles obtenus avec les cellules PARP-2^{KD} et PARG^{KD}.

Ainsi, dans les trois lignées cellulaires dépourvues de PARP2, PARG ou Cdk5, le recrutement d'ALC1 atteint son maximum plus tard par rapport aux Contrôles et plus remarquablement, sous ces conditions expérimentales, ALC1 persiste au site du photo-dommage. Ces résultats suggèrent qu'en plus de PARP-1 ces trois protéines, PARP-2, PARG et Cdk5 sont aussi impliquées dans la régulation de recrutement et de dissociation d'ALCI ce qui pourrait avoir d'importantes conséquences sur le remodelage de la structure chromatinienne en réponse aux dommages d'ADN. Un modèle d'action de ces protéines est proposé ci-après dans la discussion.

2. Impact de la déplétion de PARP-1 sur la cinétique de recrutement de CAF1 au site du dommage d'ADN.

Parallèlement à ALC1, l'étude des cinétiques de recrutement du facteur CAF-1 aux sites des micro-irradiations dans les différentes lignées cellulaires était envisagée. Ces études sont en cours et seuls les travaux préliminaires concernant les cellules Contrôles et PARP-1^{KD} sont présentés ici. Ces résultats restent à confirmer.

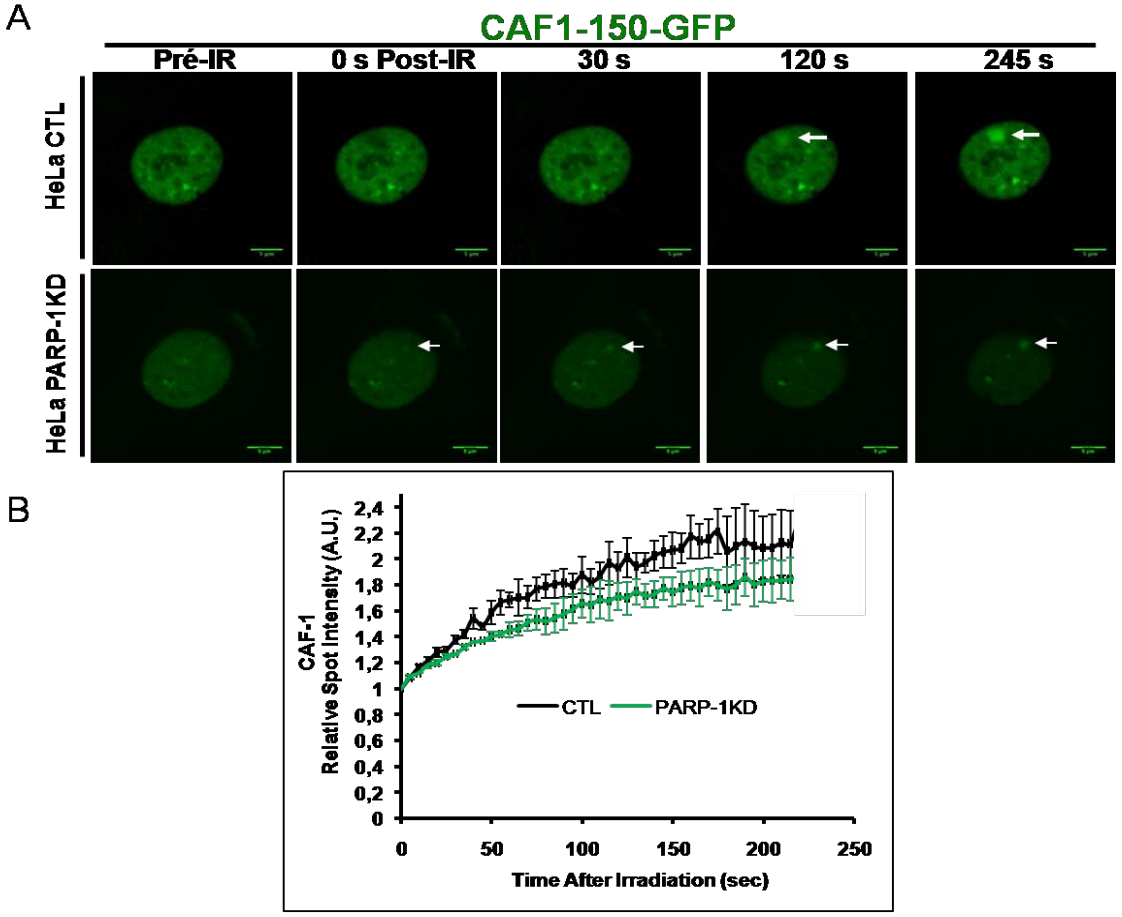


Figure 31 : Recrutement de CAF-1 aux sites des dommages d'ADN dans des cellules HeLa Contrôles et PARP-1^{KD}. (A) Des photos obtenues par vidéo-microscopie de cellules vivantes, micro-irradiées et exprimant CAF-1-GFP. Barre = 5 µm. (B) Cinétiques de recrutement d'ALC1-YFP, en fonction de temps, aux sites des micro-irradiations. Les valeurs représentent les moyennes des intensités de fluorescence des focis. Barres d'erreurs = SEMs, n = 4. La même Macro développée dans ImageJ pour la mesure des intensités relatives des focis dans les papiers 1 et 2 a été utilisée. Les résultats sont obtenus d'une seule expérience. Nombre de cellules examinées = 3-5.

Ces résultats, préliminaires, montrent une légère diminution du recrutement de CAF-1-GFP au site du photo-dommage dans les cellules PARP-1^{KD} par rapport aux cellules Contrôles. Ceci suggère donc un possible rôle de PARP-1 et/ou de son activité dans le mécanisme de recrutement de CAF-1 en réponse aux dommages d'ADN.

III. Discussion - Conclusions

Les modifications post-traductionnelles des histones et des protéines chromatiniennes non histoniques jouent un rôle très important dans le remodelage de la chromatine. Elles régulent les activités et le recrutement des facteurs chromatiniens à des régions chromosomiques spécifiques afin de moduler la structure chromatinienne en réponse à différents processus cellulaires comme la transcription, la réplication et la réparation d'ADN. La relaxation de la chromatine est un évènement critique pour la réparation d'ADN et est associée à la modification post-traductionnelle par poly(ADP-ribose)ylation. En conséquence de sa poly(ADP-ribose)ylation la chromatine adopte une structure plus relâchée (108) facilitant la réparation d'ADN (8,98,136,319,426). ALC1, dont le recrutement aux sites des dommages d'ADN dépend des PARs et dont l'activité de glissement des nucléosome dépend de l'activité de PARP-1 (3,183), est supposée être un facteur relaxant de la structure chromatinienne pendant la réparation de ces dommages (3). PARP-1 était la seule protéine de réparation d'ADN connue à avoir une relation avec ce facteur chromatinien. Or, la régulation du niveau des PARs dans les cellules en réponse aux dommages d'ADN, via la modulation d'activité de PARP-1 par Cdk5 (Article n°1) et d'activité de PARG par PARP-2 (Article n°2), suggère un mécanisme régulant le recrutement d'ALC1 plus complexe.

Cette 3ème partie de mon travaille nous a permis en premier temps de confirmer le rôle majeur de PARP-1 dans le recrutement de ALC1. Le niveau maximal d'ALC1 recruté au site du dommage dans les cellules Contrôles diminue d'environ 80 % dans les cellules PARP-1^{KD} montrant que le recrutement d'ALC1 dépond majoritairement de PARP-1 et de son activité (Figure 28 a et b). La sensibilité des cellules U2OS dépourvues d'ALC1 aux effets létales de la Camptothécine et du H_2O_2 (3) fait penser que cette diminution de recrutement d'ALC1 au site du dommage pourrait être à l'origine de l'hyper-radiosensibilité des cellules HeLa PARP-1^{KD} (Figure 24). Malgré que les cellules PARP-1^{KD} religue normalement les CSBs d'ADN (Article n°2 – Figure 6 a), il est possible que cette hyper-radiosensibilité soit due à un dysfonctionnement d'un autre processus cellulaire que la réparation suite à d'importantes modifications de la structure chromatinienne qui pourront survenir à cause des lésions d'ADN et de l'absence de l'activité d'ALC1 pour le glissement des nucléosomes. Effectivement, l'analyse d'immunocomplexes associé à ALC1 par spectrométrie de masse a montré la présence des protéines impliquées dans la réparation d'ADN et aussi d'autres qui sont impliquées dans d'autres processus (3,167) comme RPA1/2 et RFC2/5 dans la réplication, EIF4A1 dans la transcription et API5 dans l'apoptose (3). En plus, l'analyse de diffusion de

XRCC1 recrutée au site du dommage (Article n°2 - Figure 2) montre que la déplétion de PARP-1 pourrait causer un changement important dans la structure chromatinienne (pour plus de détail regarder la « discussion – conclusion » de la 2ème partie des résultats). En ce qui concerne CAF-1 qui est responsable de la déposition de nouvelles histones aux sites néo-réparé (412) nos résultats préliminaires montrant la diminution de recrutement de CAF-1 au site du dommage dans les cellules PARP-1^{KD} (Figure 31) suggèrent l'apparition, après induction du dommage et réparation, d'une structure chromatinienne inappropriée pour les cellules provoquant peut être leur radiosensibilité.

Dans un deuxième temps, nous avons élucidé pour la première fois le double rôle de PARP-2 dans la régulation de la réponse d'ALC1 au dommage d'ADN. En effet, PARP-2 est nécessaire pour le recrutement rapide d'ALC1 et au même temps pour sa dissociation du site du dommage (Figure 28). La diminution de la vitesse du recrutement d'ALC1 au site du dommage en absence de PARP-2 montre que PARP-2 aussi participe au recrutement d'ALC1. Cependant la persistance d'ALC1 au site du dommage dans les cellules PARP-2^{KD} proportionnelle au niveau élevé des PARs synthétisés dans ces cellules à cause de la diminution d'activité PARG (Article n°2) montre que la présence de PARP-2 est nécessaire pour la dissociation d'ALC1. Bien que la persistance d'ALC1 au site du dommage pourrait provoquer d'importants remaniements chromatiniens dans les cellules dépourvues de PARP-2, ces dernières réparent de façon normale les CSBs et ne présentent aucun signe de radiosensibilité élevée par rapport aux cellules Contrôles (Article n°2 – Figure 6 a et b). L'ensemble de ces résultats montre que les modifications de la structure chromatinienne qui peuvent survenir dans les cellules PARP-2^{KD} à cause de la persistance d'ALC1 au site du dommage sont des remaniements qui préservent la résistance de ces cellules et leur chromatine aux radiations ionisantes.

Egalement à la déplétion de PARP-2 les déplétions de PARG ou de Cdk5 provoquent toutes les deux une persistance d'ALC1 recruté au site du dommage (Figure 29 et 30). Les trois lignées PARP-2^{KD}, $PARG^{KD}$ et $Cdk5^{KD}$ présentent un niveau élevé de PARs après induction des dommages par rapport à la lignée Contrôle ce qui pourrait rendre explication à cette persistance d'ALC1, dont le recrutement est PAR dépendant, au site du dommage. L'impact de la déplétion de PARG sur la dissociation d'ALC1 est fort probablement la conséquence d'un effet direct sur la modification post-traductionnelle d'ALC1 par poly(ADP-ribose)ylation. Cependant l'impact de la déplétion de Cdk5 est peut être la conséquence d'un effet indirect qui passe par deux étapes : l'inhibition de la phosphorylation de PARP-1 sur les trois sérines 785, 786 et 787, et la sur-activation de PARP-1 (Article n°1). Toutefois, nous

n'excluons pas qu'une probable phosphorylation de PARP-2 par Cdk5 pourrait provoquer la dissociation d'ALC1 via la modification d'activité et/ou de recrutement de PARP-2 qui par conséquence affect l'activité PARG et le niveau des PARs synthétisés (Article n°2).

En conclusion, les diminutions de recrutement d'ALC1 et de CAF-1 au site du dommage dans les cellules PARP-1^{KD} suggèrent une possible participation des remaniements chromatiniens dus à ces diminutions dans la radiosensibilité de ces cellules. L'ensemble des résultats obtenus mettent en évidence l'implication des facteurs du BER (PARP-1, PARP-2, PARG et Cdk5) et/ou du niveau des PARs dans la dynamique de remodelage de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN. Globalement cette étude montre l'importance des modifications post-traductionnelles par poly(ADP-ribose)ylation et par phosphorylation dans le remodelage de la chromatine en réponse aux dommages à l'ADN. En même temps elle présente un bon début pour l'identification de cibles, chromatiniennes, potentielles pour la radiothérapie des cancers.

Conclusion générale et Perspectives

Ce travail de thèse a eu pour objectifs de caractériser les liens existants entre Cdk5 et la régulation de l'activité PARP, dans un but à long terme de comprendre comment ils peuvent influencer la réponse aux rayonnements et être mis à profit dans un cadre thérapeutique. L'approche utilisée était : i) la caractérisation du rôle de Cdk5 dans la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN radio-induits ainsi que dans la radiosensibilité et l'identification des mécanismes moléculaires sous-jacents; ii) l'étude du rôle précis de PARP-2 dans les voies BER/SSBR de la réparation de l'ADN, et de l'effet de sa déplétion sur la radiosensibilité des cellules humaines HeLa ; et iii) l'étude de l'impact de la déficience de PARP-1, PARP-2, PARG ou Cdk5 sur les mécanismes de recrutement des facteurs chromatiniens CAF1 et ALC1 afin d'aider à comprendre le rôle capital du maintien de la structure chromatinienne en réponse aux radiations ionisantes et le rôle de la poly(ADP-ribosyl)ation dans ces processus.

• • •

La première partie de mes travaux nous a permis d'apporter de nombreux éléments à la compréhension du rôle de Cdk5 dans la réponse aux dommages de l'ADN. Les résultats que nous avons obtenus montrent que, dans trois clones indépendants de la lignée cellulaire HeLa déplétée de manière stable pour Cdk5, l'absence de Cdk5 sensibilise les cellules non seulement à l'action d'un inhibiteur de PARP mais également à l'action des radiations ionisantes. Nous avons ensuite caractérisé la réponse cellulaire aux CSBs de l'ADN après irradiation et observé que les cellules déficientes pour Cdk5 sont capables d'effectuer la religation des CSBs avec les mêmes cinétiques que la lignée Contrôle. De plus, suite aux expériences utilisant la NCS comme seul inducteur de dommages, il semble que les cellules $Cdk5^{KD}$ soient également capables de réparer les CDBs. Ces résultats suggèrent que les mécanismes moléculaires sous-jacents de la radiosensibilité des cellules $Cdk5^{KD}$ ne sont pas dus à une incapacité de réparer les CSBs ou les CDBs radioinduites. Cependant, on ne peut pas exclure que cette radiosensibilité ne soit pas reliée au traitement des CSBs au cours de la phase S ou au lien existant entre le traitement de ces CSBs et les points de contrôle du cycle cellulaire. Les travaux de Turner et al. (508) indiquant que les cellules déficientes pour Cdk5 sont sensibles à l'effet délétère de la Camptothécine (un poison de Topoisomérase I) vont dans ce sens. En effet, ils ont pu montrer que les cassures simple-brin de l'ADN étaient transformées en cassures double-brin au cours de la phase S par collision des fourches de réplication avec les complexes formés entre l'ADN et la Camptothécine. Le rôle de Cdk5 dans le contrôle du cycle cellulaire a été abondamment étudié dans un contexte neuronal où

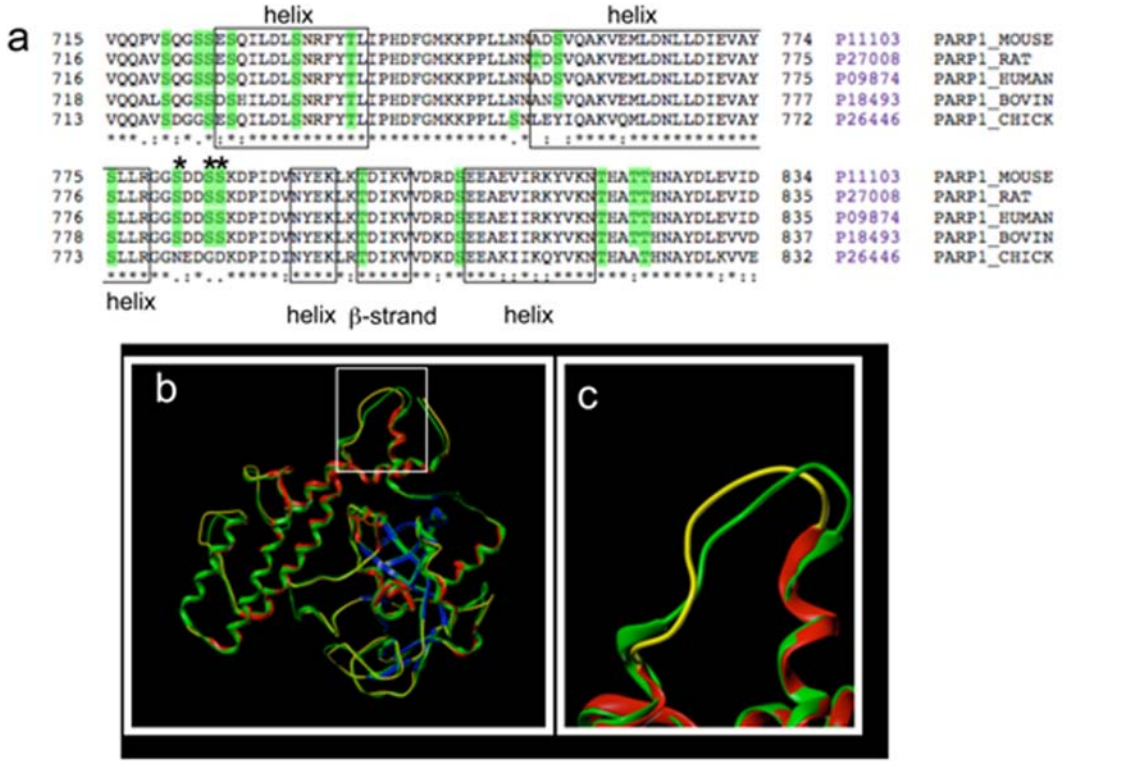
Cdk5 joue un rôle primordial dans l'entrée en division des neurones avant la mort cellulaire (87,524,544). En dehors des neurones, Turner et al. (508) ont montré qu'il existait dans les cellules en cycle déficientes pour Cdk5, un défaut dans les points de contrôle intra-S et G2/M suite à une irradiation de 10 Gy. Par la suite, dans le but de vérifier cette hypothèse, il est essentiel d'étudier la réponse aux dommages de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire sur des cellules synchronisées dans les différentes phases du cycle cellulaire et d'en préciser le rôle exact de Cdk5.

L'étude du recrutement des protéines essentielles à la réparation des CSBs aux sites de dommages de l'ADN induits par une micro-irradiation laser a montré que l'absence de Cdk5 entraîne des modifications du fonctionnement des voies de réparation BER/SSBR, notamment en termes de recrutement de PCNA et de PARP-1.

En absence de Cdk5, l'augmentation observée du niveau de PCNA recruté au site du dommage suggère une fonctionnalité du SSBR via une compensation du SPR inactif par un LPR plus actif.

La déplétion de Cdk5 ou la mutation des sites de phosphorylation de PARP-1 par Cdk5, affecte le recrutement de PARP-1 aux sites des dommages. Dans ce dernier cas, le recrutement altéré de PARP-1 peut être la conséquence de changements conformationnelles de la protéine suite à la substitution des sérines 782, 785 et 786 en alanines. Nous ignorons si la phosphorylation de toutes les sérines de PARP-1 phosphorylables par Cdk5 est nécessaire pour moduler l'activité PARP-1 ou si un ou deux sites sont suffisants. Cependant, ces changements conformationnelles sont peu probables. En effet, les comparaisons inter-espèces des structures de la PARP-1 disponibles dans les banques de données, ont montré que ces résidus sont situés dans une boucle externe, flexible et hautement accessible de PARP-1. Ces analyses ont également pu révéler que contrairement aux autres espèces, les sérines 782, 785 et 786 de la PARP-1 du poulet ne sont pas conservées et sont remplacées respectivement par une asparagine, une glycine et un acide aspartique (figure 32). Le panneau « a » montre un alignement des structures des hélices alpha et des feuillets béta de la PARP-1 humaine (www.ebi.ac.uk/pdbsum/2rd6) et du poulet (www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1efy) et des structures prédictives des PARP-1 bovine et murine. Les sérines et thréonines sont surlignées en vert et les sérines 782, 785 et 786 notées d'un astérisque. Le panneau « b » montre une superposition des structures des PARP-1 humaine et de poulet modélisées à partir du logiciel SYBYL-X (TRIPOS®), où l'on peut voir que les deux structures ne différent globalement que de 1 Å. Le panneau « c » montre un grossissement de la boucle contenant les sérines 782, 785 et 786. Basées sur ces comparaisons, nous pensons qu'un certain degré de liberté est

acceptable dans cette région sans modification conformationnelle et que les résultats obtenus à partir des résidus mutés de la PARP-1 en alanines confortent l'hypothèse que la phosphorylation de un ou plusieurs sites de PARP-1 par Cdk5 est nécessaire à son recrutement maximal aux sites de dommages. Il est prévu par la suite d'examiner plus en détails le(s) site(s) de phosphorylation incriminé(s).



Inter-species PARP-1 structure comparisons. Panel a shows the PARP-1 protein sequences from mouse, rat, human, bovin and chick. In the PARP-1 chick sequence the amino acids that are equivalent to the human protein sequence at positions serines 782, 785 and 786 are asparagine, glycine and aspartic acid respectively. The boxes indicate the amino acids contained in helixes or beta-strands either based on the publically available structures of the human PARP-1 (www.ebi.ac.uk/pdbsum/2rd6) and the chick PARP-1 (www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1efy) or in the predicted structures of rat, mouse and bovine PARP-1. Serines and threonines are highlighted in green. Panel b shows that an overlay of the human and chick PARP-1 structures, based on the SYBYL-X 1.3 software from TRIPOS®, shows an overall structure difference of less than 1Å. Panel c details the loop (the box on panel b) containing the serines 782, 784 and 785 in the two species.

Figure 32 : Comparaison des structures de PARP-1 chez la souris, chez le rat, chez le bovin, chez le poulet et chez l'homme (sources : a- www.ebi.ac.uk/pdbsum/2rd6, www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1efy, b- logiciel SYBYL-X (TRIPOS®)).

• • •

Dans la deuxième partie de mes travaux nous avons pu montrer que la présence de PARP-2 est nécessaire pour le recrutement maximal aux sites de photo-dommages de PARP-1 et de XRCC1 (facteurs du SPR) et de PCNA (protéine clé du LPR). Ces résultats suggèrent que PARP-2 est impliquée dans les deux sous voies du BER/SSBR. Le changement des cinétiques de recrutement de PARP-1 et de XRCC1 est probablement la conséquence de niveau élevé des PARs formés dans les cellules dépourvues de PARP-2 après leur exposition aux RI. Nos résultats montrent que ce niveau élevé des PARs corrèle avec une diminution concomitante de l'activité PARG et suggère que PARP-2 est un régulateur de l'activité de

PARG. Cependant, le mode de régulation de PARG par la PARP-2 n'est pas encore connu. Il est possible que cette régulation soit modulée par une interaction protéine-protéine. Pour vérifier cette hypothèse nous envisageons de faire des tests d'immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-PARP-2 qui semblent plus spécifiques que ceux dirigés contre la PARG.

L'ensemble de nos résultats montre que i) la présence de PARP-2 est nécessaire pour un recrutement maximal de PCNA, ii) PARP-2 régule l'activité de PARG. Basé sur les travaux indiquant que PARG interagit avec PCNA et probablement régule le LP-BER (363), nous suggérons que PARP-2 est également impliquée dans la régulation du LP-BER. L'étude du recrutement de PARG dans les cellules PARP-2^{KD} apportera plus d'élément pour la mise en évidence du rôle de PARP-2 dans la régulation de cette sous voie du BER/SSBR. De plus, cette étude révèle qu'en réponse aux dommages de l'ADN, PARP-2 joue un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme de la poly(ADP-ribose)ylation via deux modes d'action : la synthèse des polymères et leur dégradation via la régulation de l'activité PARG. Cependant, malgré la participation de PARP-2 dans le SPR et le LPR, sa déplétion n'affecte ni les cinétiques de religation des cassures simple-brin, ni la radiosensibilité des cellules. Ceci montre que les diminutions de recrutement des PARP-1, XRCC1 et PCNA ainsi que les modifications de l'activité PARG provoquées par la déplétion de PARP-2 ne sont pas suffisantes pour influencer la radiosensibilité des cellules ou sont compensées dans cette lignée par d'autres voies de régulation. Toutefois, l'inhibition de l'activité PARP-2 dans les cellules dépourvues de PARP-1 affecte la rapidité du SSBR et augmente légèrement la radiosensibilité de ces cellules.

• • •

Dans la troisième partie de mes travaux de thèse nous avons confirmé le rôle majeur de PARP-1 et de son activité enzymatique pour le recrutement d'ALC1 au site du photo-dommage. Bien que la déplétion de PARP-1 diminue fortement le recrutement d'ALC1 (ce qui peut affecter les remaniements chromatiniens induits en réponse au dommage de l'ADN), les cellules déplétées pour PARP-1 sont capables de réparer les CSBs radio-induites (Figure 6a – Article 2). Il apparaît donc essentiel de vérifier les effets à long terme et les conséquences d'un recrutement altéré d'ALC1 sur l'organisation des histones. De plus, nos résultats préliminaires montrent que la déplétion de PARP-1 diminue également le recrutement de CAF-1 au site du dommage, cette diminution peut être la conséquence directe de la déplétion de PARP-1 comme elle peut être la conséquence d'altération du recrutement d'ALC1. La diminution du recrutement de CAF-1 pourrait affecter le bon repositionnement de nouvelles

histones à proximité du site du dommage réparé et affecter ainsi la restructuration de la chromatine. L'ensemble de ces résultats suggère que la radiosensibilité des cellules PARP-1^{KD} n'est pas due à un dysfonctionnement dans la réparation des CSBs mais pourrait être la conséquence d'un remodelage altéré de la structure chromatinienne après induction et réparation des CSBs. En effet, la chromatine joue un rôle important dans plusieurs processus cellulaires autres que la réparation de l'ADN, et qui sont nécessaires pour la vie et la prolifération des cellules. Il est probable qu'une restitution non conforme ou partielle de la structure chromatinienne après induction et réparation des dommages de l'ADN, puisse affecter le bon déroulement de ces processus et provoquer ainsi la mort cellulaire. Toutefois il n'est pas exclu que la radiosensibilité des cellules PARP-1^{KD} soit due à un défaut dans la réparation d'éventuelles CDBs photo-induites.

L'étude du recrutement d'ALC1 nous a permis de montrer que les trois protéines PARP-2, PARG ou Cdk5 influent sur le recrutement et la dissociation d'ALC1 du site du photo-dommage. Le point commun entre ces trois lignées cellulaires est qu'elles présentent un niveau plus élevé de PARs, avec un taux maximal dans les cellules $PARG^{KD}$. Ceci suggère que si le recrutement d'ALC1 aux sites des photo-dommages est dépendant de l'activité de la PARP-1, sa dissociation est dépendante de la présence de PARP-1 automodifiée ou du niveau de polymères formés. La limitation du recrutement de PARP-1 automodifiée dans les cellules $Cdk5^{KD}$ serait plutôt en faveur d'une régulation du recrutement d'ALC1 via les PARs. Notre hypothèse est que la persistance d'ALC1 au site du photo-dommage serait plutôt due à son interaction, via les PARs, avec les histones hyper-poly(ADP-ribose)ylées du fait de l'hyper-activation de PARP-1 en absence de Cdk5 d'une part, ou à cause de la diminution de l'activité PARG en absence de PARP-2 d'autre part. Cette hypothèse est étayée par les travaux d'Ahel et al. (3) qui ont montré qu'ALC1 interagit avec les histones H3 et H2B poly(ADP-ribose)ylées.

Plusieurs travaux mettent en évidence le fait que les protéines de la réparation s'assemblent aux sites des dommages selon une organisation spatiale, débutant au niveau de la cassure et s'étendant de part et d'autre de la lésion (pour revue, voir (411)). De la même façon, les protéines de la réparation agissent séquentiellement, de façon coordonnée dans le temps. Les protéines de la réparation des CSBs s'accumulent très rapidement au niveau des dommages pour atteindre un maximum 2 minutes environ après traitement alors que les protéines de réparation des CDBs via la voie du NHEJ s'accumulent en quelques secondes mais sont dissociées jusqu'à 2 heures après formation de la lésion. Ces différences temporelles ne peuvent être expliquées qu'en partie par une étroite relation entre la réparation

des CDBs de l'ADN et la phase du cycle cellulaire dans laquelle la lésion a eu lieu. Cependant, alors qu'une organisation spatio-temporelle des facteurs et des protéines chromatiniennes a également été montrée (pour revue voir (410)), on ne connaît pas encore précisément les séquences d'événements liant ces deux niveaux d'organisations. Nous avons pu montrer que le recrutement du facteur chromatinien CAF-1 dépend de l'activité de PARP-1 et que la dissociation d'ALC1 est influencée par un excès de polymères formés. Il reste à démontrer si ces modifications temporelles de remodelage de la chromatine affectent par la suite l'organisation des processus de réparation et peuvent influencer à long terme le devenir de la cellule.

L'observation d'un effet similaire de la déplétion de PARP-2, PARG ou Cdk5 sur la persistance d'ALC1 suggère l'existence de relations fonctionnelles entre ces différentes protéines. Nos travaux ont montré un rôle potentiel de PARP-2 sur l'activité de la PARG et un rôle avéré de Cdk5 sur l'activité de PARP-1. La phosphorylation de PARP-1 par Cdk5 nous a conduit à des études prédictives par bio-informatique qui ont révélé l'existence de sites potentiels de phosphorylation par Cdk5 sur PARP-2 et PARG. Cependant la confirmation de l'existence de ces sites par spectrométrie de masse reste à démontrer, ainsi que leur validation in vivo.

Si la présence de ces sites de phosphorylation sur PARP-2 et PARG est confirmée, cela place la protéine Cdk5 comme un facteur clé dans la régulation des processus de réparation et de remodelage de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN.

Par la suite, les fonctions d'ALC1 et de CAF-1 et les relations entre Cdk5, PARP-1, PARP-2 et PARG et leurs rôles dans la régulation du mode d'action de ces facteurs chromatiniens pourra certainement aider à mieux comprendre comment ces protéines de réparation de l'ADN assurent en même temps le maintien de l'intégrité chromatinienne après dommages. Il reste également à déterminer comment ces interactions peuvent être mises à profit dans des traitements thérapeutiques comme la radiothérapie par exemple. Turner et al. ont décrit une perte génomique de *CDK5* dans 5,5% des cancers du sein (508). Il est important de confirmer et de valider cette information sur des études à plus grande échelle et sur d'autres pathologies cancéreuses afin d'établir un profil d'expression génique de *CDK5* dans le but de sélectionner une sous-population de patients qui pourrait bénéficier d'un traitement combiné de radiothérapie et d'inhibiteurs de PARPs. De plus, la modification de l'activité de Cdk5 pourrait également être une cible thérapeutique additionnelle dans ce traitement combiné.

Bibliographie

1. Abraham R.T. PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. DNA repair 3(8-9):883-887, 2004.

2. Aguilar-Quesada R., Munoz-Gamez J.A., Martin-Oliva D., Peralta A., Valenzuela M.T., Matinez-Romero R., Quiles-Perez R., Menissier-de Murcia J., de Murcia G., Ruiz de Almodovar M. and Oliver F.J. Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. BMC molecular biology 8:29, 2007.

3. Ahel D., Horejsi Z., Wiechens N., Polo S.E., Garcia-Wilson E., Ahel I., Flynn H., Skehel M., West S.C., Jackson S.P., Owen-Hughes T. and Boulton S.J. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. Science (New York, N.Y 325(5945):1240-1243, 2009.

4. Ahnesorg P., Smith P. and Jackson S.P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. Cell 124(2):301-313, 2006.

5. Alani E., Sokolsky T., Studamire B., Miret J.J. and Lahue R.S. Genetic and biochemical analysis of Msh2p-Msh6p: role of ATP hydrolysis and Msh2p-Msh6p subunit interactions in mismatch base pair recognition. Molecular and cellular biology 17(5):2436-2447, 1997.

6. Allinson S.L., Dianova, II and Dianov G.L. Poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair: always engaged, but not essential for DNA damage processing. Acta biochimica Polonica 50(1):169-179, 2003.

7. Altaf M., Saksouk N. and Cote J. Histone modifications in response to DNA damage. Mutation research 618(1-2):81-90, 2007.

8. Althaus F.R., Hofferer L., Kleczkowska H.E., Malanga M., Naegeli H., Panzeter P.L. and Realini C.A. Histone shuttling by poly ADP-ribosylation. Molecular and cellular biochemistry 138(1-2):53-59, 1994.

9. Althaus F.R., Kleczkowska H.E., Malanga M., Muntener C.R., Pleschke J.M., Ebner M. and Auer B. Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism. Molecular and cellular biochemistry 193(1-2):5-11, 1999.

10. Alvarez-Gonzalez R. and Jacobson M.K. Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo. Biochemistry 26(11):3218-3224, 1987.

11. Ame J.C., Fouquerel E., Gauthier L.R., Biard D., Boussin F.D., Dantzer F., de Murcia G. and Schreiber V. Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells. Journal of cell science 122(Pt 12):1990-2002, 2009.

12. Ame J.C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Hoger T., Menissier-de Murcia J. and de Murcia G. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. The Journal of biological chemistry 274(25):17860-17868, 1999.

13. Ame J.C., Spenlehauer C. and de Murcia G. The PARP superfamily. Bioessays 26(8):882-893, 2004.

14. Anne S.L., Saudou F. and Humbert S. Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons. J Neurosci 27(27):7318-7328, 2007.

15. Annunziata C.M. and O'Shaughnessy J. Poly (ADP-ribose) polymerase as a novel therapeutic target in cancer. Clin Cancer Res 16(18):4517-4526, 2010.

16. Aoufouchi S. and Shall S. Regulation by phosphorylation of Xenopus laevis poly(ADP-ribose) polymerase enzyme activity during oocyte maturation. The Biochemical journal 325 (Pt 2):543-551, 1997.

17. Aoufouchi S., Yelamos J. and Milstein C. Inhibition of apoptosis of a PARP(-)/(-)cell line transfected with PARP DNA-binding domain mutants. Journal of molecular biology 290(5):943-949, 1999.

18. Aspinwall R., Rothwell D.G., Roldan-Arjona T., Anselmino C., Ward C.J., Cheadle J.P., Sampson J.R., Lindahl T., Harris P.C. and Hickson I.D. Cloning and characterization of a functional human homolog of Escherichia coli endonuclease III. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(1):109-114, 1997.

19. Audebert M., Salles B. and Calsou P. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. The Journal of biological chemistry 279(53):55117-55126, 2004.

20. Audebert M., Salles B., Weinfeld M. and Calsou P. Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. Journal of molecular biology 356(2):257-265, 2006.

21. Augustin A., Spenlehauer C., Dumond H., Menissier-De Murcia J., Piel M., Schmit A.C., Apiou F., Vonesch J.L., Kock M., Bornens M. and De Murcia G. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. Journal of cell science 116(Pt 8):1551-1562, 2003.

22. Badie C., Iliakis G., Foray N., Alsbeih G., Cedervall B., Chavaudra N., Pantelias G., Arlett C. and Malaise E.P. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines. Radiation research 144(1):26-35, 1995.

23. Bai P., Houten S.M., Huber A., Schreiber V., Watanabe M., Kiss B., de Murcia G., Auwerx J. and Menissier-de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 [corrected] controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma [corrected] heterodimer. The Journal of biological chemistry 282(52):37738-37746, 2007.

24. Baldeyron C., Soria G., Roche D., Cook A.J. and Almouzni G. HP1alpha recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair. The Journal of cell biology 193(1):81-95, 2011.

25. Banasik M., Komura H., Shimoyama M. and Ueda K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. The Journal of biological chemistry 267(3):1569-1575, 1992.

26. Bauer P.I., Farkas G., Buday L., Mikala G., Meszaros G., Kun E. and Farago A. Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly ADP-ribose polymerase protein catalysed by protein kinase C. Biochemical and biophysical research communications 187(2):730-736, 1992.

27. Bauer P.I., Farkas G., Mihalik R., Kopper L., Kun E. and Farago A. Phosphorylation of poly(ADP-ribose)polymerase protein in human peripheral lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. Biochimica et biophysica acta 1223(2):234-239, 1994.

28. Beausoleil S.A., Jedrychowski M., Schwartz D., Elias J.E., Villen J., Li J., Cohn M.A., Cantley L.C. and Gygi S.P. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(33):12130-12135, 2004.

29. Beausoleil S.A., Villen J., Gerber S.A., Rush J. and Gygi S.P. A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. Nature biotechnology 24(10):1285-1292, 2006.

30. Beckert S., Farrahi F., Perveen Ghani Q., Aslam R., Scheuenstuhl H., Coerper S., Konigsrainer A., Hunt T.K. and Hussain M.Z. IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase. Biochemical and biophysical research communications 341(1):67-72, 2006.

31. Bekker-Jensen S., Fugger K., Danielsen J.R., Gromova I., Sehested M., Celis J., Bartek J., Lukas J. and Mailand N. Human Xip1 (C2orf13) is a novel regulator of cellular responses to DNA strand breaks. The Journal of biological chemistry 282(27):19638-19643, 2007.

32. Benjamin R.C. and Gill D.M. Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. The Journal of biological chemistry 255(21):10502-10508, 1980.

33. Bentley D.J., Harrison C., Ketchen A.M., Redhead N.J., Samuel K., Waterfall M., Ansell J.D. and Melton D.W. DNA ligase I null mouse cells show normal DNA repair activity but altered DNA replication and reduced genome stability. Journal of cell science 115(Pt 7):1551-1561, 2002.

34. Bernges F. and Zeller W.J. Combination effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and DNA-damaging agents in ovarian tumor cell lines--with special reference to cisplatin. Journal of cancer research and clinical oncology 122(11):665-670, 1996.

35. Bertoncini C.R. and Meneghini R. DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3'-phosphoglycolate termini. Nucleic acids research 23(15):2995-3002, 1995.

36. Biard D.S. Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. Nucleic acids research 35(11):3535-3550, 2007.

37. Biard D.S., Despras E., Sarasin A. and Angulo J.F. Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing. Mol Cancer Res 3(9):519-529, 2005.

38. Blaydes J.P. and Hupp T.R. DNA damage triggers DRB-resistant phosphorylation of human p53 at the CK2 site. Oncogene 17(8):1045-1052, 1998.

39. Blocher D., Einspenner M. and Zajackowski J. CHEF electrophoresis, a sensitive technique for the determination of DNA double-strand breaks. International journal of radiation biology 56(4):437-448, 1989.

40. Blocher D. and Kunhi M. DNA double-strand break analysis by CHEF (clamped homogeneous electrical field) electrophoresis. International journal of radiation biology 58(1):23-34, 1990.

41. Boehler C., Gauthier L.R., Mortusewicz O., Biard D.S., Saliou J.M., Bresson A., Sanglier-Cianferani S., Smith S., Schreiber V., Boussin F. and Dantzer F. Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(7):2783-2788, 2011.

42. Boiteux S. and Radicella J.P. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. Archives of biochemistry and biophysics 377(1):1-8, 2000.

43. Bolin C., Boudra M.T., Fernet M., Vaslin L., Pennaneach V., Zaremba T., Biard D., Cordelieres F.P., Favaudon V., Megnin-Chanet F. and Hall J. The impact of cyclin-dependent kinase 5 depletion on poly(ADP-ribose) polymerase activity and responses to radiation. Cell Mol Life Sci, 2011.

44. Boorstein R.J., Cummings A., Jr., Marenstein D.R., Chan M.K., Ma Y., Neubert T.A., Brown S.M. and Teebor G.W. Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1. The Journal of biological chemistry 276(45):41991-41997, 2001.

45. Boulton S., Pemberton L.C., Porteous J.K., Curtin N.J., Griffin R.J., Golding B.T. and Durkacz B.W. Potentiation of temozolomide-induced cytotoxicity: a comparative study of the biological effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. British journal of cancer 72(4):849-856, 1995.

46. Bowes J., Piper J. and Thiemermann C. Inhibitors of the activity of poly (ADP-ribose) synthetase reduce the cell death caused by hydrogen peroxide in human cardiac myoblasts. British journal of pharmacology 124(8):1760-1766, 1998.

47. Bowes J. and Thiemermann C. Effects of inhibitors of the activity of poly (ADP-ribose) synthetase on the liver injury caused by ischaemia-reperfusion: a comparison with radical scavengers. British journal of pharmacology 124(6):1254-1260, 1998.

48. Bowman K.J., Newell D.R., Calvert A.H. and Curtin N.J. Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells in vitro. British journal of cancer 84(1):106-112, 2001.

49. Bradshaw P.S., Stavropoulos D.J. and Meyn M.S. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. Nature genetics 37(2):193-197, 2005.

50. Brehm A., Tufteland K.R., Aasland R. and Becker P.B. The many colours of chromodomains. Bioessays 26(2):133-140, 2004.

51. Brem R., Fernet M., Chapot B. and Hall J. The methyl methanesulfonate induced S-phase delay in XRCC1-deficient cells requires ATM and ATR. DNA repair 7(6):849-857, 2008.

52. Brem R. and Hall J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. Nucleic acids research 33(8):2512-2520, 2005.

53. Brenner D.J. and Sachs R.K. Chromosomal "fingerprints" of prior exposure to densely ionizing radiation. Radiation research 140(1):134-142, 1994.

54. Brenner D.J., Ward J.F. and Sachs R.K. Track structure, chromosome geometry and chromosome aberrations. Basic life sciences 63:93-109; discussion 109-113, 1994.

55. Brown J.M. Therapeutic targets in radiotherapy. International journal of radiation oncology, biology, physics 49(2):319-326, 2001.

56. Burkart W., Jung T. and Frasch G. Damage pattern as a function of radiation quality and other factors. Comptes rendus de l'Academie des sciences 322(2-3):89-101, 1999.

57. Burkovics P., Hajdu I., Szukacsov V., Unk I. and Haracska L. Role of PCNA-dependent stimulation of 3'-phosphodiesterase and 3'-5' exonuclease activities of human Ape2 in repair of oxidative DNA damage. Nucleic acids research 37(13):4247-4255, 2009.

58. Burnett G. and Kennedy E.P. The enzymatic phosphorylation of proteins. The Journal of biological chemistry 211(2):969-980, 1954.

59. Buyukgebiz A., Cemeroglu A.P., Bober E., Mohn A. and Chiarelli F. Factors influencing remission phase in children with type 1 diabetes mellitus. J Pediatr Endocrinol Metab 14(9):1585-1596, 2001.

60. Buzko O. and Shokat K.M. A kinase sequence database: sequence alignments and family assignment. Bioinformatics (Oxford, England) 18(9):1274-1275, 2002.

61. Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L. and Sauvaigo S. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. Biological chemistry 383(6):933-943, 2002.

62. Cadet J., Berger M., Douki T. and Ravanat J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. Rev Physiol Biochem Pharmacol 131:1-87, 1997.

63. Caiafa P., Guastafierro T. and Zampieri M. Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. Faseb J 23(3):672-678, 2009.

64. Caldecott K.W. Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. DNA repair 6(4):443-453, 2007.

65. Caldecott K.W. Single-strand break repair and genetic disease. Nat Rev Genet 9(8):619-631, 2008.

66. Caldecott K.W. XRCC1 and DNA strand break repair. DNA repair 2(9):955-969, 2003.

67. Caldecott K.W., Aoufouchi S., Johnson P. and Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. Nucleic acids research 24(22):4387-4394, 1996.

68. Caldecott K.W., McKeown C.K., Tucker J.D., Ljungquist S. and Thompson L.H. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. Molecular and cellular biology 14(1):68-76, 1994.

69. Caldecott K.W., Tucker J.D., Stanker L.H. and Thompson L.H. Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. Nucleic acids research 23(23):4836-4843, 1995.

70. Callebaut I., Malivert L., Fischer A., Mornon J.P., Revy P. and de Villartay J.P. Cernunnos interacts with the XRCC4 x DNA-ligase IV complex and is homologous to the yeast nonhomologous end-joining factor Nej1. The Journal of biological chemistry 281(20):13857-13860, 2006.

71. Campalans A., Marsin S., Nakabeppu Y., O'Connor T R., Boiteux S. and Radicella J.P. XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair. DNA repair 4(7):826-835, 2005.

72. Cantoni O., Murray D. and Meyn R.E. Induction and repair of DNA single-strand breaks in EM9 mutant CHO cells treated with hydrogen peroxide. Chemico-biological interactions 63(1):29-38, 1987.

73. Cappelli E., Taylor R., Cevasco M., Abbondandolo A., Caldecott K. and Frosina G. Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. The Journal of biological chemistry 272(38):23970-23975, 1997.

74. Cardoso M.C., Joseph C., Rahn H.P., Reusch R., Nadal-Ginard B. and Leonhardt H. Mapping and use of a sequence that targets DNA ligase I to sites of DNA replication in vivo. The Journal of cell biology 139(3):579-587, 1997.

75. Carson C.T., Schwartz R.A., Stracker T.H., Lilley C.E., Lee D.V. and Weitzman M.D. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. The EMBO journal 22(24):6610-6620, 2003.

76. Catalgol B., Wendt B., Grimm S., Breusing N., Ozer N.K. and Grune T. Chromatin repair after oxidative stress: role of PARP-mediated proteasome activation. Free radical biology & medicine 48(5):673-680, 2010.

77. Chae T., Kwon Y.T., Bronson R., Dikkes P., Li E. and Tsai L.H. Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. Neuron 18(1):29-42, 1997.

78. Chakravarti D., Ibeanu G.C., Tano K. and Mitra S. Cloning and expression in Escherichia coli of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase. The Journal of biological chemistry 266(24):15710-15715, 1991.

79. Chambon P., Weill J.D. and Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. Biochemical and biophysical research communications 11:39-43, 1963.

80. Chatterjee P.K., Chatterjee B.E., Pedersen H., Sivarajah A., McDonald M.C., Mota-Filipe H., Brown P.A., Stewart K.N., Cuzzocrea S., Threadgill M.D. and Thiemermann C. 5-Aminoisoquinolinone reduces renal injury and dysfunction caused by experimental ischemia/reperfusion. Kidney international 65(2):499-509, 2004.

81. Chavaudra N., Bourhis J. and Foray N. Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin. Radiother Oncol 73(3):373-382, 2004.

82. Cheong N., Perrault A.R., Wang H., Wachsberger P., Mammen P., Jackson I. and Iliakis G. DNA-PK-independent rejoining of DNA double-strand breaks in human cell extracts in vitro. International journal of radiation biology 75(1):67-81, 1999.

83. Chiang S.K. and Lam T.T. Post-treatment at 12 or 18 hours with 3-aminobenzamide ameliorates retinal ischemia-reperfusion damage. Investigative ophthalmology & visual science 41(10):3210-3214, 2000.

84. Choi H.S., Lee Y., Park K.H., Sung J.S., Lee J.E., Shin E.S., Ryu J.S. and Kim Y.H. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter of the CDK5 gene and lung cancer risk in a Korean population. Journal of human genetics 54(5):298-303, 2009.

85. Christmann M., Tomicic M.T., Roos W.P. and Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. Toxicology 193(1-2):3-34, 2003.

86. Chun H.H. and Gatti R.A. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. DNA repair 3(8-9):1187-1196, 2004.

87. Cicero S. and Herrup K. Cyclin-dependent kinase 5 is essential for neuronal cell cycle arrest and differentiation. J Neurosci 25(42):9658-9668, 2005.

88. Citarelli M., Teotia S. and Lamb R.S. Evolutionary history of the poly(ADP-ribose) polymerase gene family in eukaryotes. BMC evolutionary biology 10:308, 2010.

89. Cleaver J.E. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. Nature reviews 5(7):564-573, 2005.

90. Cleaver J.E. Splitting hairs--discovery of a new DNA repair and transcription factor for the human disease trichothiodystrophy. DNA repair 4(2):285-287, 2005.

91. Clements P.M., Breslin C., Deeks E.D., Byrd P.J., Ju L., Bieganowski P., Brenner C., Moreira M.C., Taylor A.M. and Caldecott K.W. The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4. DNA repair 3(11):1493-1502, 2004.

92. Cohausz O., Blenn C., Malanga M. and Althaus F.R. The roles of poly(ADP-ribose)-metabolizing enzymes in alkylation-induced cell death. Cell Mol Life Sci 65(4):644-655, 2008.

93. Cohen-Armon M., Visochek L., Rozensal D., Kalal A., Geistrikh I., Klein R., Bendetz-Nezer S., Yao Z. and Seger R. DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. Molecular cell 25(2):297-308, 2007.

94. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Molecular biotechnology 26(3):249-261, 2004.

95. Contreras-Vallejos E., Utreras E. and Gonzalez-Billault C. Going out of the brain: Non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5. Cellular signalling, 2011.

96. Corpet A. and Almouzni G. Making copies of chromatin: the challenge of nucleosomal organization and epigenetic information. Trends in cell biology 19(1):29-41, 2009.

97. Creissen D. and Shall S. Regulation of DNA ligase activity by poly(ADP-ribose). Nature 296(5854):271-272, 1982.

98. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I. and Poirier G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. The Biochemical journal 342 (Pt 2):249-268, 1999.

99. D'Amours D. and Jackson S.P. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3(5):317-327, 2002.

100. Daniel J.A., Pray-Grant M.G. and Grant P.A. Effector proteins for methylated histones: an expanding family. Cell cycle (Georgetown, Tex 4(7):919-926, 2005.

101. Dantzer F., Ame J.C., Schreiber V., Nakamura J., Menissier-de Murcia J. and de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. Methods in enzymology 409:493-510, 2006.

102. Dantzer F., de La Rubia G., Menissier-De Murcia J., Hostomsky Z., de Murcia G. and Schreiber V. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. Biochemistry 39(25):7559-7569, 2000.

103. Dantzer F., Giraud-Panis M.J., Jaco I., Ame J.C., Schultz I., Blasco M., Koering C.E., Gilson E., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. and Schreiber V. Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. Molecular and cellular biology 24(4):1595-1607, 2004.

104. Dantzer F., Mark M., Quenet D., Scherthan H., Huber A., Liebe B., Monaco L., Chicheportiche A., Sassone-Corsi P., de Murcia G. and Menissier-de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(40):14854-14859, 2006.

105. Dantzer F., Noel G. and Schreiber V. [PARP inhibitors: significant progress in cancer therapy]. Bulletin du cancer 98(3):277-290, 2011.

106. Date H., Igarashi S., Sano Y., Takahashi T., Takahashi T., Takano H., Tsuji S., Nishizawa M. and Onodera O. The FHA domain of aprataxin interacts with the C-terminal region of XRCC1. Biochemical and biophysical research communications 325(4):1279-1285, 2004.

107. Davidovic L., Vodenicharov M., Affar E.B. and Poirier G.G. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. Experimental cell research 268(1):7-13, 2001.

108. de Murcia G., Huletsky A., Lamarre D., Gaudreau A., Pouyet J., Daune M. and Poirier G.G. Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation. The Journal of biological chemistry 261(15):7011-7017, 1986.

109. de Murcia G. and Menissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. Trends in biochemical sciences 19(4):172-176, 1994.

110. de Murcia J.M., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Walztinger C., Chambon P. and de Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(14):7303-7307, 1997.

111. De Ruyck K., Szaumkessel M., De Rudder I., Dehoorne A., Vral A., Claes K., Velghe A., Van Meerbeeck J. and Thierens H. Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. Mutation research 631(2):101-110, 2007.

112. Deans A.J. and West S.C. DNA interstrand crosslink repair and cancer. Nature reviews 11(7):467-480, 2011.

113. Delalle I., Bhide P.G., Caviness V.S., Jr. and Tsai L.H. Temporal and spatial patterns of expression of p35, a regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5, in the nervous system of the mouse. Journal of neurocytology 26(5):283-296, 1997.

114. DeMott M.S., Shen B., Park M.S., Bambara R.A. and Zigman S. Human RAD2 homolog 1 5'-to 3'-exo/endonuclease can efficiently excise a displaced DNA fragment containing a 5'-terminal abasic lesion by endonuclease activity. The Journal of biological chemistry 271(47):30068-30076, 1996.

115. Demple B. and Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. Annual review of biochemistry 63:915-948, 1994.

116. Desai-Mehta A., Cerosaletti K.M. and Concannon P. Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. Molecular and cellular biology 21(6):2184-2191, 2001.

117. Dhariwala F.A. and Rajadhyaksha M.S. An unusual member of the Cdk family: Cdk5. Cellular and molecular neurobiology 28(3):351-369, 2008.

118. Dhavan R. and Tsai L.H. A decade of CDK5. Nat Rev Mol Cell Biol 2(10):749-759, 2001.

119. Di Paola R., Genovese T., Caputi A.P., Threadgill M., Thiemermann C. and Cuzzocrea S. Beneficial effects of 5-aminoisoquinolinone, a novel, potent, water-soluble, inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. European journal of pharmacology 492(2-3):203-210, 2004.

120. Dianov G., Price A. and Lindahl T. Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. Molecular and cellular biology 12(4):1605-1612, 1992.

121. Dianova, II, Sleeth K.M., Allinson S.L., Parsons J.L., Breslin C., Caldecott K.W. and Dianov G.L. XRCC1-DNA polymerase beta interaction is required for efficient base excision repair. Nucleic acids research 32(8):2550-2555, 2004.

122. DiGiuseppe J.A. and Dresler S.L. Bleomycin-induced DNA repair synthesis in permeable human fibroblasts: mediation of long-patch and short-patch repair by distinct DNA polymerases. Biochemistry 28(24):9515-9520, 1989.

123. Dikomey E., Dahm-Daphi J., Brammer I., Martensen R. and Kaina B. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. International journal of radiation biology 73(3):269-278, 1998.

124. Dinant C., de Jager M., Essers J., van Cappellen W.A., Kanaar R., Houtsmuller A.B. and Vermeulen W. Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods. Journal of cell science 120(Pt 15):2731-2740, 2007.

125. Ding Y., Zhou Y., Lai Q., Li J., Gordon V. and Diaz F.G. Long-term neuroprotective effect of inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase in rats with middle cerebral artery occlusion using a behavioral assessment. Brain research 915(2):210-217, 2001.

126. Dionne I., Brown N.J., Woodgate R. and Bell S.D. On the mechanism of loading the PCNA sliding clamp by RFC. Molecular microbiology 68(1):216-222, 2008.

127. Divine K.K., Gilliland F.D., Crowell R.E., Stidley C.A., Bocklage T.J., Cook D.L. and Belinsky S.A. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. Mutation research 461(4):273-278, 2001.

128. Dogliotti E., Fortini P., Pascucci B. and Parlanti E. The mechanism of switching among multiple BER pathways. Progress in nucleic acid research and molecular biology 68:3-27, 2001.

129. Donawho C.K., Luo Y., Luo Y., Penning T.D., Bauch J.L., Bouska J.J., Bontcheva-Diaz V.D., Cox B.F., DeWeese T.L., Dillehay L.E., Ferguson D.C., Ghoreishi-Haack N.S., Grimm D.R., Guan R., Han E.K., Holley-Shanks R.R., Hristov B., Idler K.B., Jarvis K., Johnson E.F., Kleinberg L.R., Klinghofer V., Lasko L.M., Liu X., Marsh K.C., McGonigal T.P., Meulbroek J.A., Olson A.M., Palma J.P., Rodriguez L.E., Shi Y., Stavropoulos J.A., Tsurutani A.C., Zhu

G.D., Rosenberg S.H., Giranda V.L. and Frost D.J. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. Clin Cancer Res 13(9):2728-2737, 2007.

130. Dou H., Mitra S. and Hazra T.K. Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. The Journal of biological chemistry 278(50):49679-49684, 2003.

131. Douki T. and Cadet J. Modification of DNA bases by photosensitized one-electron oxidation. International journal of radiation biology 75(5):571-581, 1999.

132. Douki T C.J. Radiation Chemistry from Basics to applications in materiall and life sciences. ISBN 978-2-7598-0024-7:177- 189, 2008.

133. Drablos F., Feyzi E., Aas P.A., Vaagbo C.B., Kavli B., Bratlie M.S., Pena-Diaz J., Otterlei M., Slupphaug G. and Krokan H.E. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. DNA repair 3(11):1389-1407, 2004.

134. Dyson M.H., Thomson S. and Mahadevan L.C. Heat shock, histone H3 phosphorylation and the cell cycle. Cell cycle (Georgetown, Tex 4(1):13-17, 2005.

135. Eisen J.A., Sweder K.S. and Hanawalt P.C. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. Nucleic acids research 23(14):2715-2723, 1995.

136. El-Khamisy S.F., Masutani M., Suzuki H. and Caldecott K.W. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. Nucleic acids research 31(19):5526-5533, 2003.

137. El-Khamisy S.F., Saifi G.M., Weinfeld M., Johansson F., Helleday T., Lupski J.R. and Caldecott K.W. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. Nature 434(7029):108-113, 2005.

138. Emmert S., Schneider T.D., Khan S.G. and Kraemer K.H. The human XPG gene: gene architecture, alternative splicing and single nucleotide polymorphisms. Nucleic acids research 29(7):1443-1452, 2001.

139. Enright H.U., Miller W.J. and Hebbel R.P. Nucleosomal histone protein protects DNA from iron-mediated damage. Nucleic acids research 20(13):3341-3346, 1992.

140. Erdelyi K., Bai P., Kovacs I., Szabo E., Mocsar G., Kakuk A., Szabo C., Gergely P. and Virag L. Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. Faseb J 23(10):3553-3563, 2009.

141. Ethier C., Labelle Y. and Poirier G.G. PARP-1-induced cell death through inhibition of the MEK/ERK pathway in MNNG-treated HeLa cells. Apoptosis 12(11):2037-2049, 2007.

142. Evans A.R., Limp-Foster M. and Kelley M.R. Going APE over ref-1. Mutation research 461(2):83-108, 2000.

143. Evans M.D., Dizdaroglu M. and Cooke M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutation research 567(1):1-61, 2004.

144. Ewing R.M., Chu P., Elisma F., Li H., Taylor P., Climie S., McBroom-Cerajewski L., Robinson M.D., O'Connor L., Li M., Taylor R., Dharsee M., Ho Y., Heilbut A., Moore L., Zhang S., Ornatsky O., Bukhman Y.V., Ethier M., Sheng Y., Vasilescu J., Abu-Farha M.,

Lambert J.P., Duewel H.S., Stewart, II, Kuehl B., Hogue K., Colwill K., Gladwish K., Muskat B., Kinach R., Adams S.L., Moran M.F., Morin G.B., Topaloglou T. and Figeys D. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. Molecular systems biology 3:89, 2007.

145. Fahrer J., Kranaster R., Altmeyer M., Marx A. and Burkle A. Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. Nucleic acids research 35(21):e143, 2007.

146. Fan J., Otterlei M., Wong H.K., Tomkinson A.E. and Wilson D.M., 3rd. XRCC1 co-localizes and physically interacts with PCNA. Nucleic acids research 32(7):2193-2201, 2004.

147. Fang W.H., Li G.M., Longley M., Holmes J., Thilly W. and Modrich P. Mismatch repair and genetic stability in human cells. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 58:597-603, 1993.

148. Faraone-menella M. Chromatin architecture and functions : the role(s) of poly(ADP-ribose)polymerase and poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins. Biochem. Cell Biol. 83:396-404, 2005.

149. Favaudon V. Gamma-radiolysis study of the reductive activation of neocarzinostatin by the carboxyl radical. Biochimie 65(11-12):593-607, 1983.

150. Favaudon V. On the mechanism of reductive activation in the mode of action of some anticancer drugs. Biochimie 64(7):457-475, 1982.

151. Favaudon V., Charnas R.L. and Goldberg I.H. Poly(deoxyadenylic-deoxythymidylic acid) damage by radiolytically activated neocarzinostatin. Biochemistry 24(2):250-259, 1985.

152. Favaudon V H.C. Thérapeutiques ciblées et radiothérapie. Cancer Radiothérapie 8:S113-S119, 2004.

153. Feldmann E., Schmiemann V., Goedecke W., Reichenberger S. and Pfeiffer P. DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. Nucleic acids research 28(13):2585-2596, 2000.

154. Feldmann G., Mishra A., Hong S.M., Bisht S., Strock C.J., Ball D.W., Goggins M., Maitra A. and Nelkin B.D. Inhibiting the cyclin-dependent kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling. Cancer research 70(11):4460-4469, 2010.

155. Ferro A.M. and Olivera B.M. Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism. The Journal of biological chemistry 257(13):7808-7813, 1982.

156. Fisher A.E., Hochegger H., Takeda S. and Caldecott K.W. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Molecular and cellular biology 27(15):5597-5605, 2007.

157. Flaus A., Martin D.M., Barton G.J. and Owen-Hughes T. Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. Nucleic acids research 34(10):2887-2905, 2006.

158. Foray N., Arlett C.F. and Malaise E.P. Dose-rate effect on induction and repair rate of radiation-induced DNA double-strand breaks in a normal and an ataxia telangiectasia human fibroblast cell line. Biochimie 77(11):900-905, 1995.

159. Foray N., Priestley A., Alsbeih G., Badie C., Capulas E.P., Arlett C.F. and Malaise E.P. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. International journal of radiation biology 72(3):271-283, 1997.

160. Fortini P., Pascucci B., Belisario F. and Dogliotti E. DNA polymerase beta is required for efficient DNA strand break repair induced by methyl methanesulfonate but not by hydrogen peroxide. Nucleic acids research 28(16):3040-3046, 2000.

161. Fortini P., Pascucci B., Parlanti E., Sobol R.W., Wilson S.H. and Dogliotti E. Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. Biochemistry 37(11):3575-3580, 1998.

162. Fousteri M. and Mullenders L.H. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. Cell research 18(1):73-84, 2008.

163. Fousteri M., Vermeulen W., van Zeeland A.A. and Mullenders L.H. Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. Molecular cell 23(4):471-482, 2006.

164. Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G., Cox L.S., Lane D.P., Abbondandolo A. and Dogliotti E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. The Journal of biological chemistry 271(16):9573-9578, 1996.

165. Fu A.K., Fu W.Y., Ng A.K., Chien W.W., Ng Y.P., Wang J.H. and Ip N.Y. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(17):6728-6733, 2004.

166. Fu X., Choi Y.K., Qu D., Yu Y., Cheung N.S. and Qi R.Z. Identification of nuclear import mechanisms for the neuronal Cdk5 activator. The Journal of biological chemistry 281(51):39014-39021, 2006.

167. Gagne J.P., Isabelle M., Lo K.S., Bourassa S., Hendzel M.J., Dawson V.L., Dawson T.M. and Poirier G.G. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. Nucleic acids research 36(22):6959-6976, 2008.

168. Gagne J.P., Moreel X., Gagne P., Labelle Y., Droit A., Chevalier-Pare M., Bourassa S., McDonald D., Hendzel M.J., Prigent C. and Poirier G.G. Proteomic investigation of phosphorylation sites in poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Journal of proteome research 8(2):1014-1029, 2009.

169. Gangaraju V.K. and Bartholomew B. Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. Mutation research 618(1-2):3-17, 2007.

170. Gao C., Negash S., Guo H.T., Ledee D., Wang H.S. and Zelenka P. CDK5 regulates cell adhesion and migration in corneal epithelial cells. Mol Cancer Res 1(1):12-24, 2002.

171. Gary R., Kim K., Cornelius H.L., Park M.S. and Matsumoto Y. Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. The Journal of biological chemistry 274(7):4354-4363, 1999.

172. Gasparro F.P. The role of PUVA in the treatment of psoriasis. Photobiology issues related to skin cancer incidence. American journal of clinical dermatology 1(6):337-348, 2000.

173. Gatei M., Young D., Cerosaletti K.M., Desai-Mehta A., Spring K., Kozlov S., Lavin M.F., Gatti R.A., Concannon P. and Khanna K. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. Nature genetics 25(1):115-119, 2000.

174. Genschel J., Littman S.J., Drummond J.T. and Modrich P. Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. The Journal of biological chemistry 273(31):19895-19901, 1998.

175. Georgakilas A.G., Holt S.M., Hair J.M. and Loftin C.W. Measurement of oxidatively-induced clustered DNA lesions using a novel adaptation of single cell gel electrophoresis (comet assay). Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al Chapter 6:Unit 6 11, 2010.

176. Ghavidel A. and Schultz M.C. TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. Cell 106(5):575-584, 2001.

177. Ghosh U. and Bhattacharyya N.P. Benzamide and 4-amino 1,8 naphthalimide treatment inhibit telomerase activity by down-regulating the expression of telomerase associated protein and inhibiting the poly(ADP-ribosyl)ation of telomerase reverse transcriptase in cultured cells. The FEBS journal 272(16):4237-4248, 2005.

178. Gill D.M. and Richardson S.H. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of Escherichia coli: comparison with cholera toxin. The Journal of infectious diseases 141(1):64-70, 1980.

179. Godon C., Cordelieres F.P., Biard D., Giocanti N., Megnin-Chanet F., Hall J. and Favaudon V. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. Nucleic acids research 36(13):4454-4464, 2008.

180. Gong X., Tang X., Wiedmann M., Wang X., Peng J., Zheng D., Blair L.A., Marshall J. and Mao Z. Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. Neuron 38(1):33-46, 2003.

181. Goodhead D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. International journal of radiation biology 65(1):7-17, 1994.

182. Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P. and Blinov V.M. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. Nucleic acids research 17(12):4713-4730, 1989.

183. Gottschalk A.J., Timinszky G., Kong S.E., Jin J., Cai Y., Swanson S.K., Washburn M.P., Florens L., Ladurner A.G., Conaway J.W. and Conaway R.C. Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(33):13770-13774, 2009.

184. Gradwohl G., Mazen A. and de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase forms loops with DNA. Biochemical and biophysical research communications 148(3):913-919, 1987.

185. Green C.M. and Almouzni G. Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo. The EMBO journal 22(19):5163-5174, 2003.

186. Griffin R.J., Pemberton L.C., Rhodes D., Bleasdale C., Bowman K., Calvert A.H., Curtin N.J., Durkacz B.W., Newell D.R., Porteous J.K. and et al. Novel potent inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). Anti-cancer drug design 10(6):507-514, 1995.

187. Gu H., Marth J.D., Orban P.C., Mossmann H. and Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. Science (New York, N.Y 265(5168):103-106, 1994.

188. Gueven N., Becherel O.J., Kijas A.W., Chen P., Howe O., Rudolph J.H., Gatti R., Date H., Onodera O., Taucher-Scholz G. and Lavin M.F. Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. Human molecular genetics 13(10):1081-1093, 2004.

189. Guo S., Presnell S.R., Yuan F., Zhang Y., Gu L. and Li G.M. Differential requirement for proliferating cell nuclear antigen in 5' and 3' nick-directed excision in human mismatch repair. The Journal of biological chemistry 279(17):16912-16917, 2004.

190. Guzder S.N., Torres-Ramos C., Johnson R.E., Haracska L., Prakash L. and Prakash S. Requirement of yeast Rad1-Rad10 nuclease for the removal of 3'-blocked termini from DNA strand breaks induced by reactive oxygen species. Genes & development 18(18):2283-2291, 2004.

191. Ha H.C., Hester L.D. and Snyder S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(5):3270-3275, 2002.

192. Haber J.E. Partners and pathwaysrepairing a double-strand break. Trends Genet 16(6):259-264, 2000.

193. Hada M. and Georgakilas A.G. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. Journal of radiation research 49(3):203-210, 2008.

194. Hadi M.Z. and Wilson D.M., 3rd. Second human protein with homology to the Escherichia coli abasic endonuclease exonuclease III. Environmental and molecular mutagenesis 36(4):312-324, 2000.

195. Haince J.F., McDonald D., Rodrigue A., Dery U., Masson J.Y., Hendzel M.J. and Poirier G.G. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. The Journal of biological chemistry 283(2):1197-1208, 2008.

196. Hakme A., Wong H.K., Dantzer F. and Schreiber V. The expanding field of poly(ADP-ribosyl)ation reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. EMBO reports 9(11):1094-1100, 2008.

197. Hall E.J. Radiobiology for the radiologist (Harper & Row, Hagerstown, Maryland, 1978.

198. Hallows J.L., Chen K., DePinho R.A. and Vincent I. Decreased cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased cytoskeletal protein phosphorylation in p35 null mice. J Neurosci 23(33):10633-10644, 2003.

199. Hanai S., Kanai M., Ohashi S., Okamoto K., Yamada M., Takahashi H. and Miwa M. Loss of poly(ADP-ribose) glycohydrolase causes progressive neurodegeneration in Drosophila melanogaster. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(1):82-86, 2004.

200. Hanna M., Chow B.L., Morey N.J., Jinks-Robertson S., Doetsch P.W. and Xiao W. Involvement of two endonuclease III homologs in the base excision repair pathway for the processing of DNA alkylation damage in Saccharomyces cerevisiae. DNA repair 3(1):51-59, 2004.

201. Hashiguchi K., Matsumoto Y. and Yasui A. Recruitment of DNA repair synthesis machinery to sites of DNA damage/repair in living human cells. Nucleic acids research 35(9):2913-2923, 2007.

202. Hassa P.O., Buerki C., Lombardi C., Imhof R. and Hottiger M.O. Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. The Journal of biological chemistry 278(46):45145-45153, 2003.

203. Hassa P.O. and Hottiger M.O. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. Front Biosci 13:3046-3082, 2008.

204. Haushalter K.A., Todd Stukenberg M.W., Kirschner M.W. and Verdine G.L. Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. Curr Biol 9(4):174-185, 1999.

205. Hazra T.K., Izumi T., Boldogh I., Imhoff B., Kow Y.W., Jaruga P., Dizdaroglu M. and Mitra S. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(6):3523-3528, 2002.

206. Hegde M.L., Hazra T.K. and Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. Cell research 18(1):27-47, 2008.

207. Hellmich M.R., Pant H.C., Wada E. and Battey J.F. Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89(22):10867-10871, 1992.

208. Hendrich B., Hardeland U., Ng H.H., Jiricny J. and Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. Nature 401(6750):301-304, 1999.

209. Heo K., Kim H., Choi S.H., Choi J., Kim K., Gu J., Lieber M.R., Yang A.S. and An W. FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16. Molecular cell 30(1):86-97, 2008.

210. Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411(6835):366-374, 2001.

211. Hoogstraten D., Nigg A.L., Heath H., Mullenders L.H., van Driel R., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W. and Houtsmuller A.B. Rapid switching of TFIIH between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo. Molecular cell 10(5):1163-1174, 2002.

212. Horn P.J. and Peterson C.L. The bromodomain: a regulator of ATP-dependent chromatin remodeling? Front Biosci 6:D1019-1023, 2001.

213. Horton J.K., Joyce-Gray D.F., Pachkowski B.F., Swenberg J.A. and Wilson S.H. Hypersensitivity of DNA polymerase beta null mouse fibroblasts reflects accumulation of cytotoxic repair intermediates from site-specific alkyl DNA lesions. DNA repair 2(1):27-48, 2003.

214. Horton J.K., Watson M., Stefanick D.F., Shaughnessy D.T., Taylor J.A. and Wilson S.H. XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. Cell research 18(1):48-63, 2008.

215. Hsiao S.J. and Smith S. Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. Biochimie 90(1):83-92, 2008.

216. Hsu F.N., Chen M.C., Chiang M.C., Lin E., Lee Y.T., Huang P.H., Lee G.S. and Lin H. Regulation of androgen receptor and prostate cancer growth by cyclin-dependent kinase 5. The Journal of biological chemistry 286(38):33141-33149, 2011.

217. Huang E., Qu D., Zhang Y., Venderova K., Haque M.E., Rousseaux M.W., Slack R.S., Woulfe J.M. and Park D.S. The role of Cdk5-mediated apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 phosphorylation in neuronal death. Nature cell biology 12(6):563-571, 2010.

218. Huber A., Bai P., de Murcia J.M. and de Murcia G. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. DNA repair 3(8-9):1103-1108, 2004.

219. Huletsky A., de Murcia G., Muller S., Hengartner M., Menard L., Lamarre D. and Poirier G.G. The effect of poly(ADP-ribosyl)ation on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure. The Journal of biological chemistry 264(15):8878-8886, 1989.

220. IARC. International Agency for Research on Cancer, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Solar and Ultraviolet Radiation. Volume 55, 1992.

221. Ikeda S., Biswas T., Roy R., Izumi T., Boldogh I., Kurosky A., Sarker A.H., Seki S. and Mitra S. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of Escherichia coli endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue. The Journal of biological chemistry 273(34):21585-21593, 1998.

222. Iles N., Rulten S., El-Khamisy S.F. and Caldecott K.W. APLF (C2orf13) is a novel human protein involved in the cellular response to chromosomal DNA strand breaks. Molecular and cellular biology 27(10):3793-3803, 2007.

223. Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. Bioessays 13(12):641-648, 1991.

224. Imami K., Sugiyama N., Kyono Y., Tomita M. and Ishihama Y. Automated phosphoproteome analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nanoLC-MS using a calcined titania/C18 biphasic column. Anal Sci 24(1):161-166, 2008.

225. Irigaray P. and Belpomme D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. Carcinogenesis 31(2):135-148, 2010.

226. Izumi T., Wiederhold L.R., Roy G., Roy R., Jaiswal A., Bhakat K.K., Mitra S. and Hazra T.K. Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. Toxicology 193(1-2):43-65, 2003.

227. Jaruga P., Birincioglu M., Rosenquist T.A. and Dizdaroglu M. Mouse NEIL1 protein is specific for excision of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine from oxidatively damaged DNA. Biochemistry 43(50):15909-15914, 2004.

228. Jilani A., Ramotar D., Slack C., Ong C., Yang X.M., Scherer S.W. and Lasko D.D. Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. The Journal of biological chemistry 274(34):24176-24186, 1999.

229. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. Nat Rev Mol Cell Biol 7(5):335-346, 2006.

230. Johnson A.P. and Fairman M.P. The identification and purification of a novel mammalian DNA ligase. Mutation research 383(3):205-212, 1997.

231. Jonas W.B., Rapoza C.P. and Blair W.F. The effect of niacinamide on osteoarthritis: a pilot study. Inflamm Res 45(7):330-334, 1996.

232. Jongstra-Bilen J., Ittel M.E., Niedergang C., Vosberg H.P. and Mandel P. DNA topoisomerase I from calf thymus is inhibited in vitro by poly(ADP-ribosylation). European journal of biochemistry / FEBS 136(2):391-396, 1983.

233. Ju B.G., Solum D., Song E.J., Lee K.J., Rose D.W., Glass C.K. and Rosenfeld M.G. Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway. Cell 119(6):815-829, 2004.

234. Jun S.H., Kim T.G. and Ban C. DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. The FEBS journal 273(8):1609-1619, 2006.

235. Jung S., Miranda E.A., de Murcia J.M., Niedergang C., Delarue M., Schulz G.E. and de Murcia G.M. Crystallization and X-ray crystallographic analysis of recombinant chicken poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain produced in Sf9 insect cells. Journal of molecular biology 244(1):114-116, 1994.

236. Kalogeraki V.S., Tornaletti S., Cooper P.K. and Hanawalt P.C. Comparative TFIIS-mediated transcript cleavage by mammalian RNA polymerase II arrested at a lesion in different transcription systems. DNA repair 4(10):1075-1087, 2005.

237. Kamei H., Saito T., Ozawa M., Fujita Y., Asada A., Bibb J.A., Saido T.C., Sorimachi H. and Hisanaga S. Suppression of calpain-dependent cleavage of the CDK5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation. The Journal of biological chemistry 282(3):1687-1694, 2007.

238. Kaplan J., O'Connor M., Hake P.W. and Zingarelli B. Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase ameliorate myocardial reperfusion injury by modulation of activator protein-1 and neutrophil infiltration. Shock (Augusta, Ga 23(3):233-238, 2005.

239. Kapoor M. and Lozano G. Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(6):2834-2837, 1998.

240. Karimi-Busheri F., Daly G., Robins P., Canas B., Pappin D.J., Sgouros J., Miller G.G., Fakhrai H., Davis E.M., Le Beau M.M. and Weinfeld M. Molecular characterization of a human DNA kinase. The Journal of biological chemistry 274(34):24187-24194, 1999.

241. Karras G.I., Kustatscher G., Buhecha H.R., Allen M.D., Pugieux C., Sait F., Bycroft M. and Ladurner A.G. The macro domain is an ADP-ribose binding module. The EMBO journal 24(11):1911-1920, 2005.

242. Kauppinen T.M., Chan W.Y., Suh S.W., Wiggins A.K., Huang E.J. and Swanson R.A. Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(18):7136-7141, 2006.

243. Kavli B., Otterlei M., Slupphaug G. and Krokan H.E. Uracil in DNA--general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. DNA repair 6(4):505-516, 2007.

244. Kawamoto T., Araki K., Sonoda E., Yamashita Y.M., Harada K., Kikuchi K., Masutani C., Hanaoka F., Nozaki K., Hashimoto N. and Takeda S. Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. Molecular cell 20(5):793-799, 2005.

245. Keil C., Grobe T. and Oei S.L. MNNG-induced cell death is controlled by interactions between PARP-1, poly(ADP-ribose) glycohydrolase, and XRCC1. The Journal of biological chemistry 281(45):34394-34405, 2006.

246. Keller D.M. and Lu H. p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2.hSPT16.SSRP1 complex. The Journal of biological chemistry 277(51):50206-50213, 2002.

247. Keller D.M., Zeng X., Wang Y., Zhang Q.H., Kapoor M., Shu H., Goodman R., Lozano G., Zhao Y. and Lu H. A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. Molecular cell 7(2):283-292, 2001.

248. Kim D., Frank C.L., Dobbin M.M., Tsunemoto R.K., Tu W., Peng P.L., Guan J.S., Lee B.H., Moy L.Y., Giusti P., Broodie N., Mazitschek R., Delalle I., Haggarty S.J., Neve R.L., Lu Y. and Tsai L.H. Deregulation of HDAC1 by p25/Cdk5 in neurotoxicity. Neuron 60(5):803-817, 2008.

249. Kim J., Daniel J., Espejo A., Lake A., Krishna M., Xia L., Zhang Y. and Bedford M.T. Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. EMBO reports 7(4):397-403, 2006.

250. Kim K., Biade S. and Matsumoto Y. Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. The Journal of biological chemistry 273(15):8842-8848, 1998.

251. Kim M.Y., Mauro S., Gevry N., Lis J.T. and Kraus W.L. NAD+-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. Cell 119(6):803-814, 2004.

252. Kleine H., Poreba E., Lesniewicz K., Hassa P.O., Hottiger M.O., Litchfield D.W., Shilton B.H. and Luscher B. Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. Molecular cell 32(1):57-69, 2008.

253. Klungland A. and Bjelland S. Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. DNA repair 6(4):481-488, 2007.

254. Klungland A. and Lindahl T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). The EMBO journal 16(11):3341-3348, 1997.

255. Ko J., Humbert S., Bronson R.T., Takahashi S., Kulkarni A.B., Li E. and Tsai L.H. p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. J Neurosci 21(17):6758-6771, 2001.

256. Koh D.W., Dawson T.M. and Dawson V.L. Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. Pharmacol Res 52(1):5-14, 2005.

257. Koh D.W., Dawson T.M. and Dawson V.L. Poly(ADP-ribosyl)ation regulation of life and death in the nervous system. Cell Mol Life Sci 62(7-8):760-768, 2005.

258. Koh D.W., Lawler A.M., Poitras M.F., Sasaki M., Wattler S., Nehls M.C., Stoger T., Poirier G.G., Dawson V.L. and Dawson T.M. Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased

sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(51):17699-17704, 2004.

259. Koh D.W., Patel C.N., Ramsinghani S., Slama J.T., Oliveira M.A. and Jacobson M.K. Identification of an inhibitor binding site of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Biochemistry 42(17):4855-4863, 2003.

260. Kohn K.W. and Grimek-Ewig R.A. Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells. Cancer research 33(8):1849-1853, 1973.

261. Kong X., Mohanty S.K., Stephens J., Heale J.T., Gomez-Godinez V., Shi L.Z., Kim J.S., Yokomori K. and Berns M.W. Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells. Nucleic acids research 37(9):e68, 2009.

262. Konig K., Riemann I. and Fritzsche W. Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses. Optics letters 26(11):819-821, 2001.

263. Kraemer K.H., Patronas N.J., Schiffmann R., Brooks B.P., Tamura D. and DiGiovanna J.J. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. Neuroscience 145(4):1388-1396, 2007.

264. Kraus W.L. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. Current opinion in cell biology 20(3):294-302, 2008.

265. Krishnakumar R., Gamble M.J., Frizzell K.M., Berrocal J.G., Kininis M. and Kraus W.L. Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. Science (New York, N.Y 319(5864):819-821, 2008.

266. Krokan H.E., Otterlei M., Nilsen H., Kavli B., Skorpen F., Andersen S., Skjelbred C., Akbari M., Aas P.A. and Slupphaug G. Properties and functions of human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene. Progress in nucleic acid research and molecular biology 68:365-386, 2001.

267. Kubota Y. and Horiuchi S. Independent roles of XRCC1's two BRCT motifs in recovery from methylation damage. DNA repair 2(4):407-415, 2003.

268. Kubota Y., Nash R.A., Klungland A., Schar P., Barnes D.E. and Lindahl T. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. The EMBO journal 15(23):6662-6670, 1996.

269. Kulaksiz G., Reardon J.T. and Sancar A. Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. Molecular and cellular biology 25(22):9784-9792, 2005.

270. Kumar A., Abbotts J., Karawya E.M. and Wilson S.H. Identification and properties of the catalytic domain of mammalian DNA polymerase beta. Biochemistry 29(31):7156-7159, 1990.

271. Labhart P. Nonhomologous DNA end joining in cell-free systems. European journal of biochemistry / FEBS 265(3):849-861, 1999.

272. Lalioti V., Pulido D. and Sandoval I.V. Cdk5, the multifunctional surveyor. Cell cycle (Georgetown, Tex 9(2):284-311, 2010.

273. Lan L., Nakajima S., Oohata Y., Takao M., Okano S., Masutani M., Wilson S.H. and Yasui A. In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(38):13738-13743, 2004.

274. Langelier M.F., Servent K.M., Rogers E.E. and Pascal J.M. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. The Journal of biological chemistry 283(7):4105-4114, 2008.

275. Lavin M.F. and Kozlov S. DNA damage-induced signalling in ataxia-telangiectasia and related syndromes. Radiother Oncol 83(3):231-237, 2007.

276. Le Ber I., Moreira M.C., Rivaud-Pechoux S., Chamayou C., Ochsner F., Kuntzer T., Tardieu M., Said G., Habert M.O., Demarquay G., Tannier C., Beis J.M., Brice A., Koenig M. and Durr A. Cerebellar ataxia with oculomotor apraxia type 1: clinical and genetic studies. Brain 126(Pt 12):2761-2772, 2003.

277. Le Cam E., Fack F., Menissier-de Murcia J., Cognet J.A., Barbin A., Sarantoglou V., Revet B., Delain E. and de Murcia G. Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase. Journal of molecular biology 235(3):1062-1071, 1994.

278. Lee J.H. and Paull T.T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. Science (New York, N.Y 308(5721):551-554, 2005.

279. Lee J.H. and Paull T.T. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. Science (New York, N.Y 304(5667):93-96, 2004.

280. Lee J.M., Dedhar S., Kalluri R. and Thompson E.W. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. The Journal of cell biology 172(7):973-981, 2006.

281. Lee K.Y., Rosales J.L., Lee B.C., Chung S.H., Fukui Y., Lee N.S., Lee K.Y. and Jeong Y.G. Cdk5/p35 expression in the mouse ovary. Molecules and cells 17(1):17-22, 2004.

282. Lee M.H., Nikolic M., Baptista C.A., Lai E., Tsai L.H. and Massague J. The brain-specific activator p35 allows Cdk5 to escape inhibition by p27Kip1 in neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(8):3259-3263, 1996.

283. Lee M.S., Kwon Y.T., Li M., Peng J., Friedlander R.M. and Tsai L.H. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. Nature 405(6784):360-364, 2000.

284. Lehmann A.R. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. Biochimie 85(11):1101-1111, 2003.

285. LeRoith D. and Roberts C.T., Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. Cancer letters 195(2):127-137, 2003.

286. Levene P.A. and Alsberg C.L. The cleavage products of vitellin. Biol. Chem., 1906.

287. Levin D.S., McKenna A.E., Motycka T.A., Matsumoto Y. and Tomkinson A.E. Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. Curr Biol 10(15):919-922, 2000.

288. Lew J., Beaudette K., Litwin C.M. and Wang J.H. Purification and characterization of a novel proline-directed protein kinase from bovine brain. The Journal of biological chemistry 267(19):13383-13390, 1992.

289. Lew J., Huang Q.Q., Qi Z., Winkfein R.J., Aebersold R., Hunt T. and Wang J.H. A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. Nature 371(6496):423-426, 1994.

290. Li Z., Guan W., Li M.X., Zhong Z.Y., Qian C.Y., Yang X.Q., Liao L., Li Z.P. and Wang D. Genetic polymorphism of DNA base-excision repair genes (APE1, OGG1 and XRCC1) and their correlation with risk of lung cancer in a Chinese population. Archives of medical research 42(3):226-234.

291. Liaudet L., Soriano F.G., Szabo E., Virag L., Mabley J.G., Salzman A.L. and Szabo C. Protection against hemorrhagic shock in mice genetically deficient in poly(ADP-ribose)polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(18):10203-10208, 2000.

292. Liaudet L., Szabo E., Timashpolsky L., Virag L., Cziraki A. and Szabo C. Suppression of poly (ADP-ribose) polymerase activation by 3-aminobenzamide in a rat model of myocardial infarction: long-term morphological and functional consequences. British journal of pharmacology 133(8):1424-1430, 2001.

293. Licht C.L., Stevnsner T. and Bohr V.A. Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. American journal of human genetics 73(6):1217-1239, 2003.

294. Lieber M.R., Ma Y., Pannicke U. and Schwarz K. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. DNA repair 3(8-9):817-826, 2004.

295. Lilyestrom W., van der Woerd M.J., Clark N. and Luger K. Structural and biophysical studies of human PARP-1 in complex with damaged DNA. Journal of molecular biology 395(5):983-994, 2010.

296. Lim D.S., Kim S.T., Xu B., Maser R.S., Lin J., Petrini J.H. and Kastan M.B. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. Nature 404(6778):613-617, 2000.

297. Lin H., Chen M.C., Chiu C.Y., Song Y.M. and Lin S.Y. Cdk5 regulates STAT3 activation and cell proliferation in medullary thyroid carcinoma cells. The Journal of biological chemistry 282(5):2776-2784, 2007.

298. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362(6422):709-715, 1993.

299. Lindahl T. An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 71(9):3649-3653, 1974.

300. Lipmann F.A. and Levese P.A. Serinephosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. Biol. Chem., 1932.

301. Little J.B. Radiation carcinogenesis. Carcinogenesis 21(3):397-404, 2000.

302. Liu D.X. and Greene L.A. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. Cell and tissue research 305(2):217-228, 2001.

303. Liu J.L., Wang X.Y., Huang B.X., Zhu F., Zhang R.G. and Wu G. Expression of CDK5/p35 in resected patients with non-small cell lung cancer: relation to prognosis. Medical oncology (Northwood, London, England) 28(3):673-678, 2011.

304. Liu Y., Beard W.A., Shock D.D., Prasad R., Hou E.W. and Wilson S.H. DNA polymerase beta and flap endonuclease 1 enzymatic specificities sustain DNA synthesis for long patch base excision repair. The Journal of biological chemistry 280(5):3665-3674, 2005.

305. Ljungquist S., Kenne K., Olsson L. and Sandstrom M. Altered DNA ligase III activity in the CHO EM9 mutant. Mutation research 314(2):177-186, 1994.

306. Loizou J.I., El-Khamisy S.F., Zlatanou A., Moore D.J., Chan D.W., Qin J., Sarno S., Meggio F., Pinna L.A. and Caldecott K.W. The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. Cell 117(1):17-28, 2004.

307. Lonskaya I., Potaman V.N., Shlyakhtenko L.S., Oussatcheva E.A., Lyubchenko Y.L. and Soldatenkov V.A. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. The Journal of biological chemistry 280(17):17076-17083, 2005.

308. Loseva O., Jemth A.S., Bryant H.E., Schuler H., Lehtio L., Karlberg T. and Helleday T. PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA. The Journal of biological chemistry 285(11):8054-8060, 2010.

309. Lotze M.T. and Tracey K.J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. Nat Rev Immunol 5(4):331-342, 2005.

310. Lu T., Pan Y., Kao S.Y., Li C., Kohane I., Chan J. and Yankner B.A. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. Nature 429(6994):883-891, 2004.

311. Lu X.C., Massuda E., Lin Q., Li W., Li J.H. and Zhang J. Post-treatment with a novel PARG inhibitor reduces infarct in cerebral ischemia in the rat. Brain research 978(1-2):99-103, 2003.

312. Lukas C., Falck J., Bartkova J., Bartek J. and Lukas J. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. Nature cell biology 5(3):255-260, 2003.

313. Luo H., Chan D.W., Yang T., Rodriguez M., Chen B.P., Leng M., Mu J.J., Chen D., Songyang Z., Wang Y. and Qin J. A new XRCC1-containing complex and its role in cellular survival of methyl methanesulfonate treatment. Molecular and cellular biology 24(19):8356-8365, 2004.

314. Ma N.F., Hu L., Fung J.M., Xie D., Zheng B.J., Chen L., Tang D.J., Fu L., Wu Z., Chen M., Fang Y. and Guan X.Y. Isolation and characterization of a novel oncogene, amplified in liver cancer 1, within a commonly amplified region at 1q21 in hepatocellular carcinoma. Hepatology (Baltimore, Md 47(2):503-510, 2008.

315. Ma Y., Pannicke U., Schwarz K. and Lieber M.R. 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, 2002.

316. Mackenney V.J., Barnes D.E. and Lindahl T. Specific function of DNA ligase I in simian virus 40 DNA replication by human cell-free extracts is mediated by the amino-terminal non-catalytic domain. The Journal of biological chemistry 272(17):11550-11556, 1997.

317. Mackey Z.B., Ramos W., Levin D.S., Walter C.A., McCarrey J.R. and Tomkinson A.E. An alternative splicing event which occurs in mouse pachytene spermatocytes generates a form of

DNA ligase III with distinct biochemical properties that may function in meiotic recombination. Molecular and cellular biology 17(2):989-998, 1997.

318. Malanga M. and Althaus F.R. Poly(ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing. The Journal of biological chemistry 279(7):5244-5248, 2004.

319. Malanga M. and Althaus F.R. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire 83(3):354-364, 2005.

320. Malanga M., Pleschke J.M., Kleczkowska H.E. and Althaus F.R. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. The Journal of biological chemistry 273(19):11839-11843, 1998.

321. Maloisel L., Fabre F. and Gangloff S. DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension. Molecular and cellular biology 28(4):1373-1382, 2008.

322. Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T. and Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. Science (New York, N.Y 298(5600):1912-1934, 2002.

323. Mapelli M. and Musacchio A. The structural perspective on CDK5. Neuro-Signals 12(4-5):164-172, 2003.

324. Mari P.O., Florea B.I., Persengiev S.P., Verkaik N.S., Bruggenwirth H.T., Modesti M., Giglia-Mari G., Bezstarosti K., Demmers J.A., Luider T.M., Houtsmuller A.B. and van Gent D.C. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(49):18597-18602, 2006.

325. Marintchev A., Gryk M.R. and Mullen G.P. Site-directed mutagenesis analysis of the structural interaction of the single-strand-break repair protein, X-ray cross-complementing group 1, with DNA polymerase beta. Nucleic acids research 31(2):580-588, 2003.

326. Marsin S., Vidal A.E., Sossou M., Menissier-de Murcia J., Le Page F., Boiteux S., de Murcia G. and Radicella J.P. Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. The Journal of biological chemistry 278(45):44068-44074, 2003.

327. Maruyama T., Nara K., Yoshikawa H. and Suzuki N. Txk, a member of the non-receptor tyrosine kinase of the Tec family, forms a complex with poly(ADP-ribose) polymerase 1 and elongation factor 1alpha and regulates interferon-gamma gene transcription in Th1 cells. Clinical and experimental immunology 147(1):164-175, 2007.

328. Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J. and de Murcia G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. Molecular and cellular biology 18(6):3563-3571, 1998.

329. Matsumoto Y. and Kim K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. Science (New York, N.Y 269(5224):699-702, 1995.

330. Matsumoto Y., Kim K., Hurwitz J., Gary R., Levin D.S., Tomkinson A.E. and Park M.S. Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. The Journal of biological chemistry 274(47):33703-33708, 1999.

331. Mayer-Kuckuk P., Ullrich O., Ziegler M., Grune T. and Schweiger M. Functional interaction of poly(ADP-ribose) with the 20S proteasome in vitro. Biochemical and biophysical research communications 259(3):576-581, 1999.

332. Mazzon E., Dugo L., De S.A., Li J.H., Caputi A.P., Zhang J. and Cuzzocrea S. Beneficial effects of GPI 6150, an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. Shock (Augusta, Ga 17(3):222-227, 2002.

333. McCullough A.K., Dodson M.L. and Lloyd R.S. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. Annual review of biochemistry 68:255-285, 1999.

334. McIlwraith M.J., Vaisman A., Liu Y., Fanning E., Woodgate R. and West S.C. Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. Molecular cell 20(5):783-792, 2005.

335. McKendrick L., Milne D. and Meek D. Protein kinase CK2-dependent regulation of p53 function: evidence that the phosphorylation status of the serine 386 (CK2) site of p53 is constitutive and stable. Molecular and cellular biochemistry 191(1-2):187-199, 1999.

336. McKinnon P.J. ATM and ataxia telangiectasia. EMBO reports 5(8):772-776, 2004.

337. McMillan T.J., Leatherman E., Ridley A., Shorrocks J., Tobi S.E. and Whiteside J.R. Cellular effects of long wavelength UV light (UVA) in mammalian cells. The Journal of pharmacy and pharmacology 60(8):969-976, 2008.

338. McPhee T.R., McDonald P.C., Oloumi A. and Dedhar S. Integrin-linked kinase regulates E-cadherin expression through PARP-1. Dev Dyn 237(10):2737-2747, 2008.

339. Meira L.B., Devaraj S., Kisby G.E., Burns D.K., Daniel R.L., Hammer R.E., Grundy S., Jialal I. and Friedberg E.C. Heterozygosity for the mouse Apex gene results in phenotypes associated with oxidative stress. Cancer research 61(14):5552-5557, 2001.

340. Mélanie Spotheim-Maurizot M.M., Thierry Douki et al. Radiation Chemistry from Basics to applications in materiall and life sciences. ISBN 978-2-7598-0024-7, 2008.

341. Meldrum R.A., Botchway S.W., Wharton C.W. and Hirst G.J. Nanoscale spatial induction of ultraviolet photoproducts in cellular DNA by three-photon near-infrared absorption. EMBO reports 4(12):1144-1149, 2003.

342. Mello J.A. and Almouzni G. The ins and outs of nucleosome assembly. Current opinion in genetics & development 11(2):136-141, 2001.

343. Menissier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Ame J.C., Dierich A., LeMeur M., Sabatier L., Chambon P. and de Murcia G. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. The EMBO journal 22(9):2255-2263, 2003.

344. Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Coyle D.L., Jacobson E.L. and Jacobson M.K. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. Experimental cell research 297(2):521-532, 2004.

345. Meyer R.G., Meyer-Ficca M.L., Whatcott C.J., Jacobson E.L. and Jacobson M.K. Two small enzyme isoforms mediate mammalian mitochondrial poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) activity. Experimental cell research 313(13):2920-2936, 2007.

346. Meyerson M., Enders G.H., Wu C.L., Su L.K., Gorka C., Nelson C., Harlow E. and Tsai L.H. A family of human cdc2-related protein kinases. The EMBO journal 11(8):2909-2917, 1992.

347. Middleton M.R., Grob J.J., Aaronson N., Fierlbeck G., Tilgen W., Seiter S., Gore M., Aamdal S., Cebon J., Coates A., Dreno B., Henz M., Schadendorf D., Kapp A., Weiss J., Fraass U., Statkevich P., Muller M. and Thatcher N. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. J Clin Oncol 18(1):158-166, 2000.

348. Midorikawa R., Takei Y. and Hirokawa N. KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. Cell 125(2):371-383, 2006.

349. Miknyoczki S.J., Jones-Bolin S., Pritchard S., Hunter K., Zhao H., Wan W., Ator M., Bihovsky R., Hudkins R., Chatterjee S., Klein-Szanto A., Dionne C. and Ruggeri B. Chemopotentiation of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. Molecular cancer therapeutics 2(4):371-382, 2003.

350. Miller M.R. and Chinault D.N. Evidence that DNA polymerases alpha and beta participate differentially in DNA repair synthesis induced by different agents. The Journal of biological chemistry 257(1):46-49, 1982.

351. Miller M.R. and Chinault D.N. The roles of DNA polymerases alpha, beta, and gamma in DNA repair synthesis induced in hamster and human cells by different DNA damaging agents. The Journal of biological chemistry 257(17):10204-10209, 1982.

352. Misteli T. and Soutoglou E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. Nat Rev Mol Cell Biol 10(4):243-254, 2009.

353. Mitra S., Boldogh I., Izumi T. and Hazra T.K. Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. Environmental and molecular mutagenesis 38(2-3):180-190, 2001.

354. Mitra S., Izumi T., Boldogh I., Bhakat K.K., Chattopadhyay R. and Szczesny B. Intracellular trafficking and regulation of mammalian AP-endonuclease 1 (APE1), an essential DNA repair protein. DNA repair 6(4):461-469, 2007.

355. Mittal R.D., Mandal R.K. and Gangwar R. Base excision repair pathway genes polymorphism in prostate and bladder cancer risk in North Indian population. Mechanisms of ageing and development.

356. Molinete M., Vermeulen W., Burkle A., Menissier-de Murcia J., Kupper J.H., Hoeijmakers J.H. and de Murcia G. Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells. The EMBO journal 12(5):2109-2117, 1993.

357. Mone M.J., Bernas T., Dinant C., Goedvree F.A., Manders E.M., Volker M., Houtsmuller A.B., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W. and van Driel R. In vivo dynamics of chromatin-associated complex formation in mammalian nucleotide excision repair. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(45):15933-15937, 2004.

358. Montecucco A., Savini E., Weighardt F., Rossi R., Ciarrocchi G., Villa A. and Biamonti G. The N-terminal domain of human DNA ligase I contains the nuclear localization signal and directs the enzyme to sites of DNA replication. The EMBO journal 14(21):5379-5386, 1995.

359. Moore D.J., Taylor R.M., Clements P. and Caldecott K.W. Mutation of a BRCT domain selectively disrupts DNA single-strand break repair in noncycling Chinese hamster ovary

cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(25):13649-13654, 2000.

360. Morales J.C. and Carpenter P.B. Breaking in a new function for casein kinase 2. Sci Aging Knowledge Environ 2004(22):pe24, 2004.

361. Morgan D.O. Principles of CDK regulation. Nature 374(6518):131-134, 1995.

362. Mortusewicz O., Ame J.C., Schreiber V. and Leonhardt H. Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. Nucleic acids research 35(22):7665-7675, 2007.

363. Mortusewicz O., Fouquerel E., Ame J.C., Leonhardt H. and Schreiber V. PARG is recruited to DNA damage sites through poly(ADP-ribose)- and PCNA-dependent mechanisms. Nucleic acids research 39(12):5045-5056, 2011.

364. Mortusewicz O., Rothbauer U., Cardoso M.C. and Leonhardt H. Differential recruitment of DNA Ligase I and III to DNA repair sites. Nucleic acids research 34(12):3523-3532, 2006.

365. Mosbaugh D.W. and Linn S. Excision repair and DNA synthesis with a combination of HeLa DNA polymerase beta and DNase V. The Journal of biological chemistry 258(1):108-118, 1983.

366. Muftuoglu M., Oshima J., von Kobbe C., Cheng W.H., Leistritz D.F. and Bohr V.A. The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis. Human genetics 124(4):369-377, 2008.

367. Muftuoglu M., Wong H.K., Imam S.Z., Wilson D.M., 3rd, Bohr V.A. and Opresko P.L. Telomere repeat binding factor 2 interacts with base excision repair proteins and stimulates DNA synthesis by DNA polymerase beta. Cancer research 66(1):113-124, 2006.

368. Nash R.A., Caldecott K.W., Barnes D.E. and Lindahl T. XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. Biochemistry 36(17):5207-5211, 1997.

369. Neddermann P., Gallinari P., Lettieri T., Schmid D., Truong O., Hsuan J.J., Wiebauer K. and Jiricny J. Cloning and expression of human G/T mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. The Journal of biological chemistry 271(22):12767-12774, 1996.

370. Newman J.C., Bailey A.D. and Weiner A.M. Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(25):9613-9618, 2006.

371. Niere M., Kernstock S., Koch-Nolte F. and Ziegler M. Functional localization of two poly(ADP-ribose)-degrading enzymes to the mitochondrial matrix. Molecular and cellular biology 28(2):814-824, 2008.

372. Nikjoo H., O'Neill P., Wilson W.E. and Goodhead D.T. Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation. Radiation research 156(5 Pt 2):577-583, 2001.

373. Nikolic M., Dudek H., Kwon Y.T., Ramos Y.F. and Tsai L.H. The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. Genes & development 10(7):816-825, 1996.

374. Noel G., Giocanti N., Fernet M., Megnin-Chanet F. and Favaudon V. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery. BMC cell biology 4:7, 2003.

375. Noel G., Godon C., Fernet M., Giocanti N., Megnin-Chanet F. and Favaudon V. Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis. Molecular cancer therapeutics 5(3):564-574, 2006.

376. Nouspikel T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. Cell Mol Life Sci 66(6):994-1009, 2009.

377. Nouspikel T.P., Hyka-Nouspikel N. and Hanawalt P.C. Transcription domain-associated repair in human cells. Molecular and cellular biology 26(23):8722-8730, 2006.

378. Nowak S.J. and Corces V.G. Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. Genes & development 14(23):3003-3013, 2000.

379. Nowsheen S., Bonner J.A. and Yang E.S. The poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor ABT-888 reduces radiation-induced nuclear EGFR and augments head and neck tumor response to radiotherapy. Radiother Oncol 99(3):331-338, 2011.

380. O'Brien K.A., Lemke S.J., Cocke K.S., Rao R.N. and Beckmann R.P. Casein kinase 2 binds to and phosphorylates BRCA1. Biochemical and biophysical research communications 260(3):658-664, 1999.

381. O'Connor T.R. and Laval J. Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86(14):5222-5226, 1989.

382. O'Driscoll M. and Jeggo P.A. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. Nat Rev Genet 7(1):45-54, 2006.

383. Ogata N., Ueda K., Kawaichi M. and Hayaishi O. Poly(ADP-ribose) synthetase, a main acceptor of poly(ADP-ribose) in isolated nuclei. The Journal of biological chemistry 256(9):4135-4137, 1981.

384. Ohgushi H., Yoshihara K. and Kamiya T. Bovine thymus poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase. Physical properties and binding to DNA. The Journal of biological chemistry 255(13):6205-6211, 1980.

385. Oka S., Kato J. and Moss J. Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. The Journal of biological chemistry 281(2):705-713, 2006.

386. Okano S., Lan L., Caldecott K.W., Mori T. and Yasui A. Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. Molecular and cellular biology 23(11):3974-3981, 2003.

387. Olive P.L. DNA organization affects cellular radiosensitivity and detection of initial DNA strand breaks. International journal of radiation biology 62(4):389-396, 1992.

388. Oliver F.J., Menissier-de Murcia J., Nacci C., Decker P., Andriantsitohaina R., Muller S., de la Rubia G., Stoclet J.C. and de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. The EMBO journal 18(16):4446-4454, 1999.

389. Olsen L.C., Aasland R., Wittwer C.U., Krokan H.E. and Helland D.E. Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. The EMBO journal 8(10):3121-3125, 1989.

390. Osoba D. Effects of temozolomide in malignant brain tumours. Lancet 356(9226):342, 2000.

391. Ouararhni K., Hadj-Slimane R., Ait-Si-Ali S., Robin P., Mietton F., Harel-Bellan A., Dimitrov S. and Hamiche A. The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. Genes & development 20(23):3324-3336, 2006.

392. Paglini G. and Caceres A. The role of the Cdk5--p35 kinase in neuronal development. European journal of biochemistry / FEBS 268(6):1528-1533, 2001.

393. Park I.S., Koh H.Y., Park J.K. and Park S.D. Two different mechanisms are involved for the bleomycin-induced DNA repair synthesis in permeabilized HeLa cells. Biochemical and biophysical research communications 164(3):1226-1233, 1989.

394. Pascucci B., Russo M.T., Crescenzi M., Bignami M. and Dogliotti E. The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells. Nucleic acids research 33(1):280-288, 2005.

395. Patrick G.N., Zukerberg L., Nikolic M., de la Monte S., Dikkes P. and Tsai L.H. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. Nature 402(6762):615-622, 1999.

396. Patzke H., Maddineni U., Ayala R., Morabito M., Volker J., Dikkes P., Ahlijanian M.K. and Tsai L.H. Partial rescue of the p35-/- brain phenotype by low expression of a neuronal-specific enolase p25 transgene. J Neurosci 23(7):2769-2778, 2003.

397. Paull T.T. and Gellert M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. Genes & development 13(10):1276-1288, 1999.

398. Peltomaki. DNA mismatch repair and cancer. Mutation research 488, 2001.

399. Perkins E., Sun D., Nguyen A., Tulac S., Francesco M., Tavana H., Nguyen H., Tugendreich S., Barthmaier P., Couto J., Yeh E., Thode S., Jarnagin K., Jain A., Morgans D. and Melese T. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast. Cancer research 61(10):4175-4183, 2001.

400. Petermann E., Keil C. and Oei S.L. Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER. DNA repair 5(5):544-555, 2006.

401. Petitjean A., Achatz M.I., Borresen-Dale A.L., Hainaut P. and Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene 26(15):2157-2165, 2007.

402. Petrini J.H. and Stracker T.H. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. Trends in cell biology 13(9):458-462, 2003.

403. Petronzelli F., Riccio A., Markham G.D., Seeholzer S.H., Stoerker J., Genuardi M., Yeung A.T., Matsumoto Y. and Bellacosa A. Biphasic kinetics of the human DNA repair protein MED1 (MBD4), a mismatch-specific DNA N-glycosylase. The Journal of biological chemistry 275(42):32422-32429, 2000.

404. Petrucco S. and Percudani R. Structural recognition of DNA by poly(ADP-ribose)polymerase-like zinc finger families. The FEBS journal 275(5):883-893, 2008.

405. Pinnola A., Naumova N., Shah M. and Tulin A.V. Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity. The Journal of biological chemistry 282(44):32511-32519, 2007.

406. Pleschke J.M., Kleczkowska H.E., Strohm M. and Althaus F.R. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. The Journal of biological chemistry 275(52):40974-40980, 2000.

407. Plummer E.R., Middleton M.R., Jones C., Olsen A., Hickson I., McHugh P., Margison G.P., McGown G., Thorncroft M., Watson A.J., Boddy A.V., Calvert A.H., Harris A.L., Newell D.R. and Curtin N.J. Temozolomide pharmacodynamics in patients with metastatic melanoma: dna damage and activity of repair enzymes O6-alkylguanine alkyltransferase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. Clin Cancer Res 11(9):3402-3409, 2005.

408. Plummer R., Jones C., Middleton M., Wilson R., Evans J., Olsen A., Curtin N., Boddy A., McHugh P., Newell D., Harris A., Johnson P., Steinfeldt H., Dewji R., Wang D., Robson L. and Calvert H. Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res 14(23):7917-7923, 2008.

409. Poirier G.G., de Murcia G., Jongstra-Bilen J., Niedergang C. and Mandel P. Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 79(11):3423-3427, 1982.

410. Polo S.E. and Almouzni G. [Chromatin dynamics during the repair of DNA lesions]. Med Sci (Paris) 23(1):29-31, 2007.

411. Polo S.E. and Jackson S.P. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. Genes & development 25(5):409-433, 2011.

412. Polo S.E., Roche D. and Almouzni G. New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. Cell 127(3):481-493, 2006.

413. Pommier Y., Redon C., Rao V.A., Seiler J.A., Sordet O., Takemura H., Antony S., Meng L., Liao Z., Kohlhagen G., Zhang H. and Kohn K.W. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. Mutation research 532(1-2):173-203, 2003.

414. Pouliot J.J., Yao K.C., Robertson C.A. and Nash H.A. Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. Science (New York, N.Y 286(5439):552-555, 1999.

415. Prasad R., Dianov G.L., Bohr V.A. and Wilson S.H. FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. The Journal of biological chemistry 275(6):4460-4466, 2000.

416. Prasad R., Lavrik O.I., Kim S.J., Kedar P., Yang X.P., Vande Berg B.J. and Wilson S.H. DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. The Journal of biological chemistry 276(35):32411-32414, 2001.

417. Prasad R., Singhal R.K., Srivastava D.K., Molina J.T., Tomkinson A.E. and Wilson S.H. Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. The Journal of biological chemistry 271(27):16000-16007, 1996.

418. Quenet D., Gasser V., Fouillen L., Cammas F., Sanglier-Cianferani S., Losson R. and Dantzer F. The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha. Faseb J 22(11):3853-3865, 2008.

419. Radicella J.P., Dherin C., Desmaze C., Fox M.S. and Boiteux S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(15):8010-8015, 1997.

420. Raghavan S.C., Tong J. and Lieber M.R. Hybrid joint formation in human V(D)J recombination requires nonhomologous DNA end joining. DNA repair 5(2):278-285, 2006.

421. Rasouli-Nia A., Karimi-Busheri F. and Weinfeld M. Stable down-regulation of human polynucleotide kinase enhances spontaneous mutation frequency and sensitizes cells to genotoxic agents. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(18):6905-6910, 2004.

422. Rass E., Grabarz A., Bertrand P. and Lopez B.S. [Double Strand Break Repair, one mechanism can hide another: Alternative non-homologous end joining.]. Cancer Radiother, 2011.

423. Rass U., Ahel I. and West S.C. Actions of aprataxin in multiple DNA repair pathways. The Journal of biological chemistry 282(13):9469-9474, 2007.

424. Ratnam K. and Low J.A. Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. Clin Cancer Res 13(5):1383-1388, 2007.

425. Ravanat J.L., Douki T. and Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. Journal of photochemistry and photobiology 63(1-3):88-102, 2001.

426. Realini C.A. and Althaus F.R. Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation). The Journal of biological chemistry 267(26):18858-18865, 1992.

427. Redon C.E., Nakamura A.J., Martin O.A., Parekh P.R., Weyemi U.S. and Bonner W.M. Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. Aging 3(2):168-174, 2011.

428. Ridgway P. and Almouzni G. CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair. Journal of cell science 113 (Pt 15):2647-2658, 2000.

429. Ridley A.J., Whiteside J.R., McMillan T.J. and Allinson S.L. Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. International journal of radiation biology 85(3):177-195, 2009.

430. Rippmann J.F., Damm K. and Schnapp A. Functional characterization of the poly(ADP-ribose) polymerase activity of tankyrase 1, a potential regulator of telomere length. Journal of molecular biology 323(2):217-224, 2002.

431. Robertson A.B., Klungland A., Rognes T. and Leiros I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. Cell Mol Life Sci 66(6):981-993, 2009.

432. Roldan-Arjona T., Wei Y.F., Carter K.C., Klungland A., Anselmino C., Wang R.P., Augustus M. and Lindahl T. Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(15):8016-8020, 1997.

433. Rosales J.L., Lee B.C., Modarressi M., Sarker K.P., Lee K.Y., Jeong Y.G., Oko R. and Lee K.Y. Outer dense fibers serve as a functional target for Cdk5.p35 in the developing sperm tail. The Journal of biological chemistry 279(2):1224-1232, 2004.

434. Rosales J.L. and Lee K.Y. Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5. Bioessays 28(10):1023-1034, 2006.

435. Rosenquist T.A., Zharkov D.O. and Grollman A.P. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(14):7429-7434, 1997.

436. Rosenthal D.S., Simbulan-Rosenthal C.M., Iyer S., Smith W.J., Ray R. and Smulson M.E. Calmodulin, poly(ADP-ribose)polymerase and p53 are targets for modulating the effects of sulfur mustard. J Appl Toxicol 20 Suppl 1:S43-49, 2000.

437. Rosidi B., Wang M., Wu W., Sharma A., Wang H. and Iliakis G. Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. Nucleic acids research 36(5):1610-1623, 2008.

438. Rouleau M., Aubin R.A. and Poirier G.G. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. Journal of cell science 117(Pt 6):815-825, 2004.

439. Rouleau M., McDonald D., Gagne P., Ouellet M.E., Droit A., Hunter J.M., Dutertre S., Prigent C., Hendzel M.J. and Poirier G.G. PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery. Journal of cellular biochemistry 100(2):385-401, 2007.

440. Ruf A., Mennissier de Murcia J., de Murcia G. and Schulz G.E. Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(15):7481-7485, 1996.

441. Rulten S.L., Fisher A.E., Robert I., Zuma M.C., Rouleau M., Ju L., Poirier G., Reina-San-Martin B. and Caldecott K.W. PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. Molecular cell 41(1):33-45, 2011.

442. Saijo M., Hirai T., Ogawa A., Kobayashi A., Kamiuchi S. and Tanaka K. Functional TFIIH is required for UV-induced translocation of CSA to the nuclear matrix. Molecular and cellular biology 27(7):2538-2547, 2007.

443. Samson L., Derfler B., Boosalis M. and Call K. Cloning and characterization of a 3-methyladenine DNA glycosylase cDNA from human cells whose gene maps to chromosome 16. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88(20):9127-9131, 1991.

444. Sastry S.S. and Kun E. The interaction of adenosine diphosphoribosyl transferase (ADPRT) with a cruciform DNA. Biochemical and biophysical research communications 167(2):842-847, 1990.

445. Satoh M.S. and Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. Nature 356(6367):356-358, 1992.

446. Satoh M.S., Poirier G.G. and Lindahl T. NAD(+)-dependent repair of damaged DNA by human cell extracts. The Journal of biological chemistry 268(8):5480-5487, 1993.

447. Saxena A., Saffery R., Wong L.H., Kalitsis P. and Choo K.H. Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. The Journal of biological chemistry 277(30):26921-26926, 2002.

448. Saxena A., Wong L.H., Kalitsis P., Earle E., Shaffer L.G. and Choo K.H. Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. Human molecular genetics 11(19):2319-2329, 2002.

449. Sbodio J.I., Lodish H.F. and Chi N.W. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). The Biochemical journal 361(Pt 3):451-459, 2002.

450. Schlicker A., Peschke P., Burkle A., Hahn E.W. and Kim J.H. 4-Amino-1,8-naphthalimide: a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase and radiation sensitizer. International journal of radiation biology 75(1):91-100, 1999.

451. Schreiber V., Ame J.C., Dolle P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Menissier-de Murcia J. and de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. The Journal of biological chemistry 277(25):23028-23036, 2002.

452. Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C. and de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. Nat Rev Mol Cell Biol 7(7):517-528, 2006.

453. Sedgwick B., Bates P.A., Paik J., Jacobs S.C. and Lindahl T. Repair of alkylated DNA: recent advances. DNA repair 6(4):429-442, 2007.

454. Shall S. and de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? Mutation research 460(1):1-15, 2000.

455. Sharma P., Sharma M., Amin N.D., Albers R.W. and Pant H.C. Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(20):11156-11160, 1999.

456. Shelton S.B. and Johnson G.V. Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. Journal of neurochemistry 88(6):1313-1326, 2004.

457. Shieh W.M., Ame J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K. and Jacobson E.L. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. The Journal of biological chemistry 273(46):30069-30072, 1998.

458. Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. Annual review of genetics 31:635-662, 1997.

459. Shiloh Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. Trends in biochemical sciences 31(7):402-410, 2006.

460. Simbulan-Rosenthal C.M., Ly D.H., Rosenthal D.S., Konopka G., Luo R., Wang Z.Q., Schultz P.G. and Smulson M.E. Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(21):11274-11279, 2000.

461. Simbulan-Rosenthal C.M., Rosenthal D.S., Hilz H., Hickey R., Malkas L., Applegren N., Wu Y., Bers G. and Smulson M.E. The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. Biochemistry 35(36):11622-11633, 1996.

462. Simbulan-Rosenthal C.M., Rosenthal D.S., Iyer S., Boulares H. and Smulson M.E. Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. Molecular and cellular biochemistry 193(1-2):137-148, 1999.

463. Simbulan C.M., Suzuki M., Izuta S., Sakurai T., Savoysky E., Kojima K., Miyahara K., Shizuta Y. and Yoshida S. Poly(ADP-ribose) polymerase stimulates DNA polymerase alpha by physical association. The Journal of biological chemistry 268(1):93-99, 1993.

464. Simonin F., Hofferer L., Panzeter P.L., Muller S., de Murcia G. and Althaus F.R. The carboxyl-terminal domain of human poly(ADP-ribose) polymerase. Overproduction in Escherichia coli, large scale purification, and characterization. The Journal of biological chemistry 268(18):13454-13461, 1993.

465. Simonin F., Poch O., Delarue M. and de Murcia G. Identification of potential active-site residues in the human poly(ADP-ribose) polymerase. The Journal of biological chemistry 268(12):8529-8535, 1993.

466. Singh N., Poirier G. and Cerutti P. Tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces poly(ADP)-ribosylation in fibroblasts. The EMBO journal 4(6):1491-1494, 1985.

467. Singhal R.K., Prasad R. and Wilson S.H. DNA polymerase beta conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract. The Journal of biological chemistry 270(2):949-957, 1995.

468. Slupphaug G., Kavli B. and Krokan H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutation research 531(1-2):231-251, 2003.

469. Slupska M.M., Baikalov C., Luther W.M., Chiang J.H., Wei Y.F. and Miller J.H. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. Journal of bacteriology 178(13):3885-3892, 1996.

470. Slupska M.M., Luther W.M., Chiang J.H., Yang H. and Miller J.H. Functional expression of hMYH, a human homolog of the Escherichia coli MutY protein. Journal of bacteriology 181(19):6210-6213, 1999.

471. Smulson M., Istock N., Ding R. and Cherney B. Deletion mutants of poly(ADP-ribose) polymerase support a model of cyclic association and dissociation of enzyme from DNA ends during DNA repair. Biochemistry 33(20):6186-6191, 1994.

472. Sobol R.W., Horton J.K., Kuhn R., Gu H., Singhal R.K., Prasad R., Rajewsky K. and Wilson S.H. Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. Nature 379(6561):183-186, 1996.

473. Sobol R.W., Prasad R., Evenski A., Baker A., Yang X.P., Horton J.K. and Wilson S.H. The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. Nature 405(6788):807-810, 2000.

474. Sobol R.W. and Wilson S.H. Mammalian DNA beta-polymerase in base excision repair of alkylation damage. Progress in nucleic acid research and molecular biology 68:57-74, 2001.

475. Song J.M., Milligan J.R. and Sutherland B.M. Bistranded oxidized purine damage clusters: induced in DNA by long-wavelength ultraviolet (290-400 nm) radiation? Biochemistry 41(27):8683-8688, 2002.

476. Songyang Z., Lu K.P., Kwon Y.T., Tsai L.H., Filhol O., Cochet C., Brickey D.A., Soderling T.R., Bartleson C., Graves D.J., DeMaggio A.J., Hoekstra M.F., Blenis J., Hunter T. and Cantley L.C. A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. Molecular and cellular biology 16(11):6486-6493, 1996.

477. Sonntag C.V. The chemical basis of radiation biology. taylor and francis , londres, 1987.

478. Sossou M., Flohr-Beckhaus C., Schulz I., Daboussi F., Epe B. and Radicella J.P. APE1 overexpression in XRCC1-deficient cells complements the defective repair of oxidative single strand breaks but increases genomic instability. Nucleic acids research 33(1):298-306, 2005.

479. Southan. poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. curr Med Chem, 2003.

480. Sterpone S. and Cozzi R. Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. Journal of nucleic acids 2010, 2010.

481. Stoppa-Lyonnet D. and Aurias A. [Ataxia telangiectasia: what impact in clinical oncology?]. Bulletin du cancer 79(7):645-650, 1992.

482. Strock C.J., Park J.I., Nakakura E.K., Bova G.S., Isaacs J.T., Ball D.W. and Nelkin B.D. Cyclin-dependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells. Cancer research 66(15):7509-7515, 2006.

483. Stucki M., Pascucci B., Parlanti E., Fortini P., Wilson S.H., Hubscher U. and Dogliotti E. Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. Oncogene 17(7):835-843, 1998.

484. Sutherland B.M., Bennett P.V., Cintron N.S., Guida P. and Laval J. Low levels of endogenous oxidative damage cluster levels in unirradiated viral and human DNAs. Free radical biology & medicine 35(5):495-503, 2003.

485. Tabuchi K., Ito Z., Tsuji S., Nakagawa A., Serizawa F., Hara A. and Kusakari J. Poly(adenosine diphosphate-ribose) synthetase inhibitor 3-aminobenzamide alleviates cochlear dysfunction induced by transient ischemia. The Annals of otology, rhinology, and laryngology 110(2):118-121, 2001.

486. Tanaka Y., Koide S.S., Yoshihara K. and Kamiya T. Poly (ADP-ribose) synthetase is phosphorylated by protein kinase C in vitro. Biochemical and biophysical research communications 148(2):709-717, 1987.

487. Tang D., Yeung J., Lee K.Y., Matsushita M., Matsui H., Tomizawa K., Hatase O. and Wang J.H. An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. The Journal of biological chemistry 270(45):26897-26903, 1995.

488. Tang X., Wang X., Gong X., Tong M., Park D., Xia Z. and Mao Z. Cyclin-dependent kinase 5 mediates neurotoxin-induced degradation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. J Neurosci 25(19):4823-4834, 2005.

489. Tanuma S. and Johnson G.S. ADP-ribosylation of nonhistone high mobility group proteins in intact cells. The Journal of biological chemistry 258(7):4067-4070, 1983.

490. Tao Z., Gao P., Hoffman D.W. and Liu H.W. Domain C of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif. Biochemistry 47(21):5804-5813, 2008.

491. Tarricone C., Dhavan R., Peng J., Areces L.B., Tsai L.H. and Musacchio A. Structure and regulation of the CDK5-p25(nck5a) complex. Molecular cell 8(3):657-669, 2001.

492. Taylor R.M., Moore D.J., Whitehouse J., Johnson P. and Caldecott K.W. A cell cycle-specific requirement for the XRCC1 BRCT II domain during mammalian DNA strand break repair. Molecular and cellular biology 20(2):735-740, 2000.

493. Tebbs R.S., Flannery M.L., Meneses J.J., Hartmann A., Tucker J.D., Thompson L.H., Cleaver J.E. and Pedersen R.A. Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. Developmental biology 208(2):513-529, 1999.

494. Teitz T., Eli D., Penner M., Bakhanashvili M., Naiman T., Timme T.L., Wood C.M., Moses R.E. and Canaani D. Expression of the cDNA for the beta subunit of human casein kinase II confers partial UV resistance on xeroderma pigmentosum cells. Mutation research 236(1):85-97, 1990.

495. Tentori L., Leonetti C., Scarsella M., D'Amati G., Vergati M., Portarena I., Xu W., Kalish V., Zupi G., Zhang J. and Graziani G. Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. Clin Cancer Res 9(14):5370-5379, 2003.

496. Tentori L., Leonetti C., Scarsella M., Muzi A., Mazzon E., Vergati M., Forini O., Lapidus R., Xu W., Dorio A.S., Zhang J., Cuzzocrea S. and Graziani G. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase prevents irinotecan-induced intestinal damage and enhances irinotecan/temozolomide efficacy against colon carcinoma. Faseb J 20(10):1709-1711, 2006.

497. Thompson L.H., Brookman K.W., Dillehay L.E., Carrano A.V., Mazrimas J.A., Mooney C.L. and Minkler J.L. A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. Mutation research 95(2-3):427-440, 1982.

498. Thompson L.H., Brookman K.W., Jones N.J., Allen S.A. and Carrano A.V. Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. Molecular and cellular biology 10(12):6160-6171, 1990.

499. Thompson L.H. and Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. Mutation research 509(1-2):49-78, 2002.

500. Tian B., Yang Q. and Mao Z. Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death. Nature cell biology 11(2):211-218, 2009.

501. Timson D.J., Singleton M.R. and Wigley D.B. DNA ligases in the repair and replication of DNA. Mutation research 460(3-4):301-318, 2000.

502. Tomkinson A.E., Chen L., Dong Z., Leppard J.B., Levin D.S., Mackey Z.B. and Motycka T.A. Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases. Progress in nucleic acid research and molecular biology 68:151-164, 2001.

503. Trucco C., Oliver F.J., de Murcia G. and Menissier-de Murcia J. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. Nucleic acids research 26(11):2644-2649, 1998.

504. Tsuchimoto D., Sakai Y., Sakumi K., Nishioka K., Sasaki M., Fujiwara T. and Nakabeppu Y. Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. Nucleic acids research 29(11):2349-2360, 2001.

505. Tulin A., Naumova N.M., Menon A.K. and Spradling A.C. Drosophila poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates chromatin structure and SIR2-dependent silencing. Genetics 172(1):363-371, 2006.

506. Tulin A. and Spradling A. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at Drosophila puff loci. Science (New York, N.Y 299(5606):560-562, 2003.

507. Tulin A., Stewart D. and Spradling A.C. The Drosophila heterochromatic gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is required to modulate chromatin structure during development. Genes & development 16(16):2108-2119, 2002.

508. Turner N.C., Lord C.J., Iorns E., Brough R., Swift S., Elliott R., Rayter S., Tutt A.N. and Ashworth A. A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. The EMBO journal 27(9):1368-1377, 2008.

509. Uchida T., Ishiguro K., Ohnuma J., Takamatsu M., Yonekura S. and Imahori K. Precursor of cdk5 activator, the 23 kDa subunit of tau protein kinase II: its sequence and developmental change in brain. FEBS letters 355(1):35-40, 1994.

510. Ugrinova I., Pashev I.G. and Pasheva E.A. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates mammalian HMGB1 protein only if acetylated. Journal of biochemistry 149(5):563-568, 2011.

511. Ullrich O., Diestel A., Eyupoglu I.Y. and Nitsch R. Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. Nature cell biology 3(12):1035-1042, 2001.

512. Ullrich O., Sitte N., Sommerburg O., Sandig V., Davies K.J. and Grune T. Influence of DNA binding on the degradation of oxidized histones by the 20S proteasome. Archives of biochemistry and biophysics 362(2):211-216, 1999.

513. Umar A., Risinger J.I., Glaab W.E., Tindall K.R., Barrett J.C. and Kunkel T.A. Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6. Genetics 148(4):1637-1646, 1998.

514. Upadhyay A.K., Ajay A.K., Singh S. and Bhat M.K. Cell cycle regulatory protein 5 (Cdk5) is a novel downstream target of ERK in carboplatin induced death of breast cancer cells. Current cancer drug targets 8(8):741-752, 2008.

515. Valerie K. and Povirk L.F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. Oncogene 22(37):5792-5812, 2003.

516. Valérie Schreiber M.R., Jean-Christophe Amé, Françoise Dantzer, Véronique Meder, Catherine Spenlehauer, Patrick Stiegler, Claude Niedergang, Laure Sabatier,Vincent Favaudon, Josiane Menissier-de Murcia and Gilbert de Murcia. PARP-2: Structure-Function Relationship. Poly(ADP-Ribosyl)ation Alexander Burkle, editor ed: Landes Bioscience(Chapter 2):ISBN: 978-970-387-33371-33377, 2004.

517. Van Hoof D., Munoz J., Braam S.R., Pinkse M.W., Linding R., Heck A.J., Mummery C.L. and Krijgsveld J. Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. Cell stem cell 5(2):214-226, 2009.

518. Venema J., Mullenders L.H., Natarajan A.T., van Zeeland A.A. and Mayne L.V. The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87(12):4707-4711, 1990.

519. Vidal A.E., Boiteux S., Hickson I.D. and Radicella J.P. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. The EMBO journal 20(22):6530-6539, 2001.

520. Villen J., Beausoleil S.A., Gerber S.A. and Gygi S.P. Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(5):1488-1493, 2007.

521. Virag L. and Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacological reviews 54(3):375-429, 2002.

522. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. Trends in biochemical sciences 27(7):339-344, 2002.

523. Wacker D.A., Ruhl D.D., Balagamwala E.H., Hope K.M., Zhang T. and Kraus W.L. The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. Molecular and cellular biology 27(21):7475-7485, 2007.

524. Walker J.W., Jijon H.B. and Madsen K.L. AMP-activated protein kinase is a positive regulator of poly(ADP-ribose) polymerase. Biochemical and biophysical research communications 342(1):336-341, 2006.

525. Walter J., Cremer T., Miyagawa K. and Tashiro S. A new system for laser-UVA-microirradiation of living cells. Journal of microscopy 209(Pt 2):71-75, 2003.

526. Wang H., Zeng Z.C., Perrault A.R., Cheng X., Qin W. and Iliakis G. Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells. Nucleic acids research 29(8):1653-1660, 2001.

527. Wang M., Wu W., Wu W., Rosidi B., Zhang L., Wang H. and Iliakis G. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. Nucleic acids research 34(21):6170-6182, 2006.

528. Wang Z.Q., Stingl L., Morrison C., Jantsch M., Los M., Schulze-Osthoff K. and Wagner E.F. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. Genes & development 11(18):2347-2358, 1997.

529. Ward J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. Progress in nucleic acid research and molecular biology 35:95-125, 1988.

530. Wei F.Y., Nagashima K., Ohshima T., Saheki Y., Lu Y.F., Matsushita M., Yamada Y., Mikoshiba K., Seino Y., Matsui H. and Tomizawa K. Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. Nature medicine 11(10):1104-1108, 2005.

531. Whatcott C.J., Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G. and Jacobson M.K. A specific isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase is targeted to the mitochondrial matrix by a N-terminal mitochondrial targeting sequence. Experimental cell research 315(20):3477-3485, 2009.

532. Whitehouse C.J., Taylor R.M., Thistlethwaite A., Zhang H., Karimi-Busheri F., Lasko D.D., Weinfeld M. and Caldecott K.W. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. Cell 104(1):107-117, 2001.

533. Wiebauer K. and Jiricny J. Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase beta mediate the correction of G.T mispairs in nuclear extracts from human cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87(15):5842-5845, 1990.

534. Wilson S.H. Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. Mutation research 407(3):203-215, 1998.

535. Winters T.A., Russell P.S., Kohli M., Dar M.E., Neumann R.D. and Jorgensen T.J. Determination of human DNA polymerase utilization for the repair of a model ionizing radiation-induced DNA strand break lesion in a defined vector substrate. Nucleic acids research 27(11):2423-2433, 1999.

536. Wong H.K., Kim D., Hogue B.A., McNeill D.R. and Wilson D.M., 3rd. DNA damage levels and biochemical repair capacities associated with XRCC1 deficiency. Biochemistry 44(43):14335-14343, 2005.

537. Wong H.K. and Wilson D.M., 3rd. XRCC1 and DNA polymerase beta interaction contributes to cellular alkylating-agent resistance and single-strand break repair. Journal of cellular biochemistry 95(4):794-804, 2005.

538. Woodhouse B.C. and Dianov G.L. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. DNA repair 7(7):1077-1086, 2008.

539. Wright W.E. and Shay J.W. Telomere-binding factors and general DNA repair. Nature genetics 37(2):116-118, 2005.

540. Wu X., Ranganathan V., Weisman D.S., Heine W.F., Ciccone D.N., O'Neill T.B., Crick K.E., Pierce K.A., Lane W.S., Rathbun G., Livingston D.M. and Weaver D.T. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. Nature 405(6785):477-482, 2000.

541. Xanthoudakis S., Smeyne R.J., Wallace J.D. and Curran T. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(17):8919-8923, 1996.

542. Xiong W., Pestell R. and Rosner M.R. Role of cyclins in neuronal differentiation of immortalized hippocampal cells. Molecular and cellular biology 17(11):6585-6597, 1997.

543. Yang S.W., Burgin A.B., Jr., Huizenga B.N., Robertson C.A., Yao K.C. and Nash H.A. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(21):11534-11539, 1996.

544. Yang Y., Geldmacher D.S. and Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. J Neurosci 21(8):2661-2668, 2001.

545. Yang Y.G., Cortes U., Patnaik S., Jasin M. and Wang Z.Q. Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. Oncogene 23(21):3872-3882, 2004.

546. Yeh C.H., Chen T.P., Lee C.H., Wu Y.C., Lin Y.M. and Jing Lin P. Inhibition of poly(adp-ribose) polymerase reduces cardiomyocytic apoptosis after global cardiac arrest under cardiopulmonary bypass. Shock (Augusta, Ga 25(2):168-175, 2006.

547. Yelamos J., Monreal Y., Saenz L., Aguado E., Schreiber V., Mota R., Fuente T., Minguela A., Parrilla P., de Murcia G., Almarza E., Aparicio P. and Menissier-de Murcia J. PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. The EMBO journal 25(18):4350-4360, 2006.

548. Yelamos J., Schreiber V. and Dantzer F. Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. Trends in molecular medicine 14(4):169-178, 2008.

549. Yung W.K., Prados M.D., Yaya-Tur R., Rosenfeld S.S., Brada M., Friedman H.S., Albright R., Olson J., Chang S.M., O'Neill A.M., Friedman A.H., Bruner J., Yue N., Dugan M., Zaknoen S. and Levin V.A. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. J Clin Oncol 17(9):2762-2771, 1999.

550. Zahradka P. and Ebisuzaki K. A shuttle mechanism for DNA-protein interactions. The regulation of poly(ADP-ribose) polymerase. European journal of biochemistry / FEBS 127(3):579-585, 1982.

551. Zampieri M., Passananti C., Calabrese R., Perilli M., Corbi N., De Cave F., Guastafierro T., Bacalini M.G., Reale A., Amicosante G., Calabrese L., Zlatanova J. and Caiafa P. Parp1 localizes within the Dnmt1 promoter and protects its unmethylated state by its enzymatic activity. PloS one 4(3):e4717, 2009.

552. Zaremba T. and Curtin N.J. PARP inhibitor development for systemic cancer targeting. Anti-cancer agents in medicinal chemistry 7(5):515-523, 2007.

553. Zdzienicka M.Z., Venema J., Mitchell D.L., van Hoffen A., van Zeeland A.A., Vrieling H., Mullenders L.H., Lohman P.H. and Simons J.W. (6-4) photoproducts and not cyclobutane pyrimidine dimers are the main UV-induced mutagenic lesions in Chinese hamster cells. Mutation research 273(1):73-83, 1992.

554. Zhang S., Lin Y., Kim Y.S., Hande M.P., Liu Z.G. and Shen H.M. c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation. Cell death and differentiation 14(5):1001-1010, 2007.

555. Zhu J., Li W. and Mao Z. Cdk5: Mediator of neuronal development, death and the response to DNA damage. Mechanisms of ageing and development 132(8-9):389-394, 2011.

556. Zotter A., Luijsterburg M.S., Warmerdam D.O., Ibrahim S., Nigg A., van Cappellen W.A., Hoeijmakers J.H., van Driel R., Vermeulen W. and Houtsmuller A.B. Recruitment of the nucleotide excision repair endonuclease XPG to sites of UV-induced dna damage depends on functional TFIIH. Molecular and cellular biology 26(23):8868-8879, 2006.

557. Zukerberg L.R., Patrick G.N., Nikolic M., Humbert S., Wu C.L., Lanier L.M., Gertler F.B., Vidal M., Van Etten R.A. and Tsai L.H. Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. Neuron 26(3):633-646, 2000.

Annexes

Macro ImageJ utilize pour l'analyse des données de la video-microscpie

(Elaborer par Fabrice Cordelières, Plate-forme Imagerie, UMR146, Institut Curie)

Que fait la macro ?

1. Au lancement, la macro, détecte l'ensemble des images ouvertes et en établit la liste.
2. Une boite de dialogue propose à l'utilisateur de choisir quelle image utiliser en tant que pré-bleach et celle à utiliser en tant qu'image de post-bleach.
3. Les deux piles temporelles sont concaténées, dans l'ordre établit par l'utilisateur.
4. Si plus de deux canaux sont détectés, une boite de dialogue propose à l'utilisateur de définir le canal à utiliser. Les canaux sont alors séparés et seul est conservé celui à quantifier.
5. Le roi manager est vidé de même que la table des résultats.
6. La pile temporelle est projetée par la méthode des sommes, un seuil automatique est appliqué et l'outil "baguette magique" activé.
7. L'utilisateur est invité à ajuster le seuil et cliquer sur le noyau. Une fois l'opération réalisée, la région d'intérêt (ROI) est stockée dans le ROI manager sous le nom de "Nucleus". Son aire est stockée dans la variable "NucArea".
8. La ROI est inversée pour isoler la partie "non-noyau" de l'image : elle permettra de quantifier le bruit de fond. Cette zone est stockée en tant que "Bkgd". Son aire est stockée dans la variable "BkgdArea".
9. Un nouveau seuil automatique est appliqué à l'image. Il a pour valeur la moyenne d'intensité du noyau à laquelle est ajoutée deux fois sa déviation standard. L'utilisateur est invité à ajuster le seuil et cliquer sur le spot de photo-dommage. Une fois l'opération réalisée, la ROI est stockée dans le ROI manager sous le nom de "Spot". Son aire est stockée dans la variable "SpotArea".
10. Afin de calibrer temporellement la série d'images, le délai d'acquisition en pré- et post-bleach est demandée.
11. La variable deltaMax est initialisée à zéro : elle stockera la perte maximale de fluorescence dans le noyau et permettra ainsi de déterminer le moment précis du flash laser.
12. Pour chaque image de la pile temporelle :
    - Le temps calibré en fonction des données entrées par l'utilisateur est inscrit dans la table de résultats, dans la colonne "Time (sec)".
    - La ROI "Bkgd" est activée.
    - Son intensité totale est inscrite dans la table de résultats, dans la colonne "Bkgd".
    - La ROI "Nucleus" est activée.
    - Son intensité totale est inscrite dans la table de résultats, dans la colonne "Nucleus".
    - Si l'image courante n'est pas la première image de la pile, la différence d'intensité entre le point de temps courant et le précédent est calculée et stockée. Si le résultat est supérieur à "deltaMax", son contenu est remplacé de le point de temps correspondant stocké dans la variable "tBleach".
    - La ROI "Spot" est activée.
    - Son intensité totale est inscrite dans la table de résultats, dans la colonne "Spot".
13. Le contenu de la variable "tBleach", point de temps auquel à lei de flash laser, est affichée dans la fenêtre "Log".
14. Les valeurs d'intensité moyenne pour les 3 zones au premier point de temp sont stockées dans 3 variables : bkgdT0, nucT0 et spotT0.
15. Les valeurs d'intensités moyenne sont corrigées pour le bruit de fond et/ou le photo-blanchiment observationnel pour chaque point de temps comme suit. Les valeurs sont stockées dans le tableau de résultats :

- Intensité du noyau corrigée pour le bruit de fond et normalisée à 1 à t0 :
  Nucleus bkgd corr-normalized = $\frac{\text{intensite totale noyau(t)-intensite totale bkgd(t)*aire noyau/aire bkgd}}{\text{intensite noyau(t0)}}$
- Intensité du spot corrigée pour le bruit de fond et normalisée à 1 à t0 :
  Spot bkgd corr-normalized = $\frac{\text{intensite spot(t)-intensite totale bkgd(t)*aire spot/aire bkgd}}{\text{intensite spot(t0)}}$
- Intensité du spot corrigée pour le bruit de fond et normalisée à 1 à t0 :
  Spot bkgd corr-normalized = $\frac{\text{intensite spot(t)-intensite totale bkgd(t)*aire spot/aire bkgd}}{\text{intensite spot(t0)}}$
- Intensité du spot corrigée pour le bruit de fond, corrigée pour le photo-blanchiment observationnel et normalisée à 1 à t0 :
  Spot fold recruitment = $\frac{\text{(intensite spot(t)-intensite totale bkgd(t)*aire spot/aire bkgd)* intensité noyau(t0)}}{\text{intensite spot(t0)* intensité noyau(t)}}$

16. Sur la base même base de calcul, une copie de l'image originale corrigée pour le bruit de fond et le photo-blachiment observationnel est générée.
17. Trois graphiques sont générés, reprenant sous forme graphique l'évolution des trois valeurs décrites plus haut au cours du temps, en post-bleach.
18. L'intensité du spot corrigée pour le bruit de fond, corrigée pour le photo-blanchiment observationnel et normalisée à 1 à t0 est enfin ajustée sur un retour exponentiel de la forme y=a*(1-exp(-b*x))+c. Le temps de demi-maximum est calculé par (-ln((a+c)/2*a))/b et le maximum de recrutement déterminé. L'ensemble des résultats est envoyé vers la fenêtre "log".

Comment utiliser la macro ?

1. Télécharger et installer la dernière version d'ImageJ.
2. Mettre à jour ImageJ en allant dans le menu Help/Update ImageJ. Une boite de dialogue apparait, cliquer sur OK. La mise à jour est téléchargée et ImageJ se ferme
3. Si ce n'est déjà fait, paramétrer ImageJ :
   - Lancer ImageJ.
   - Paramétrer la mémoire maximale à allouer à ImageJ, dont dépendra la taille maximale des images ouvrables : Edit/Options/Memory and threads. Allouer 75% de la mémoire vive (RAM) de l'ordinateur, dans la limite de 1599Mb pour les systèmes 32-bits.
   - Fermer ImageJ.
4. Lancer ImageJ.
5. Avant de lancer la macro, les deux parties de la séquence à analyser doivent être ouvertes. Les images peuvent être des superpositions d'images de fluorescence et de transmission : la macro le détectera et proposera lors d'une étape ultérieure de choisir quel est le canal à utiliser.
6. Lancer la macro en glissant/déposant le texte de la macro sur la barre d'outils ImageJ.
7. Dans la fenêtre de la macro, aller dans le menu "Macro/Run macro".
8. Une boite de dialogue apparait demandant de choisir quelle image correspond au pré-bleach et quelle image correspond au post-bleach : choisir les images appropriées au moyen de la liste déroulante.
9. Si la macro détecte une image de type "composite", une boite de dialogue apparait demandant quel canal utiliser pour la quantification.
10. Un seuil automatique est proposé et appliqué sur une image de projection sommée de la séquence temporelle : ajuster le seuil si nécessaire pour mettre en surbrillance la totalité du noyau, puis cliquer à l'intérieur du noyau. Le contour de la zone sélectionnée apparait.

Cliquer sur Ok dans la boite de dialogue indiquant “Draw the nucleus ROI then click on Ok”.

11. Sur la même image, un seuil automatique est proposé et appliqué : ajuster le seuil si nécessaire pour mettre en surbrillance la zone correspondant au photo-dommage, puis cliquer à l’intérieur de la zone. Son contour apparait. Cliquer sur Ok dans la boite de dialogue indiquant “Draw the spot ROI then click on Ok”.
12. Afin de calibrer d’un point de vue temporel la séquence, l’intervalle de temps entre deux saisies en pré- et post-bleach est demandé : renseigner les rubriques correspondantes de l’interface puis cliquer sur Ok.
13. La quantification démarre : un tableau de résultat est généré, ainsi que trois graphiques. Les valeurs numériques du tableau peuvent être sauvegardées en cliquant sur sa fenêtre puis utilisant le menu “Save As”. De même, les données numériques des graphs peuvent être sauvegardées en cliquant sur le bouton “List” des graphs et utilisant le menu “Save As” dans le tableau qui s’affiche.
14. Une copie de l’image originale corrigée pour le bruit de fond et le photo-blachiment observationnel est générée.

La macro :

```
//————————————Debug only————————————
//open("/Users/fab/Desktop/Macro Mohammed/PARP1-GFP du 250107 in HeLa CTL.lif -
    Cell4 50% 500ms:FRAP Series28");
//open("/Users/fab/Desktop/Macro Mohammed/PARP1-GFP du 250107 in HeLa CTL.lif -
    Cell4 50% 500ms:FRAP Pb2 Series29");

//————————————Builds image list————————————
imgList=getImageList();
if(imgList.length<2){
  exit("At least two images should be opened");
}

//————————————GUI————————————
Dialog.create("Photodammage analyzer");
Dialog.addChoice("Pre-bleach image", imgList, imgList[0]);
Dialog.addChoice("Post-bleach image", imgList, imgList[1]);
Dialog.show();

imgPre=Dialog.getChoice();
imgPost=Dialog.getChoice();

//————————————Concatenates stacks————————————
selectWindow(imgPre);
getDimensions(width, height, channels, slices, nPre);
run("Hyperstack to Stack");
selectWindow(imgPost);
run("Hyperstack to Stack");
getDimensions(width, height, channels, slices, nPost);

run("Concatenate...", "stack1=["+imgPre+"] stack2=["+imgPost+"] title=[
    Concatenated Stacks]");
run("Stack to Hyperstack...", "order=xyczt(default) channels="+channels+" slices=1
     frames="+nPre+nPost+" display=Composite");

if(channels>1){
```

```
  choice=newArray(channels);
  for(i=0; i<channels; i++) choice[i]=""+i+1;

  Dialog.create("More than 1 channels found");
  Dialog.addChoice("Which channel is fluo ?", choice, choice[0]);
  Dialog.show();
  c=Dialog.getChoice();

  run("Split Channels");

  nImg=nImages;
  for(i=0; i<nImg; i++){
    selectImage(i+1);
    if(getTitle()!="C"+c+"-Concatenated Stacks") close();
  }
}
run("Grays");


//-----------------Checks the last slice and erase it if it's black-----------------
setSlice(nSlices);
getStatistics(area, mean, min, max, std, histogram);
if(max==0) run("Delete Slice");
setSlice(1);


//-----------------Nucleus segmentation-----------------
roiManager("reset");
run("Clear Results");
rename("Stack");
nz=nSlices;
run("Z Project...", "start=1 stop="+nSlices+" projection=[Sum Slices]");
run("Median...", "radius=5");
rename("Proj");
run("Threshold...");

//-----------------Get nucleus outlines-----------------
setTool(8);
waitForUser("Draw the nucleus ROI then click on Ok");

//-----------------Stores the "out of nucleus" ROI-----------------
run("Make Inverse");
roiManager("Add");
roiManager("select", 0);
roiManager("Rename", "Bkgd");
getStatistics(BkgdArea, mean, min, max, std, histogram);

//-----------------Stores the nucleus ROI-----------------
run("Make Inverse");
roiManager("Add");
roiManager("select", 1);
roiManager("Rename", "Nucleus");
getStatistics(NucArea, mean, min, max, std, histogram);

//-----------------Calculates a threshold for the spot (mean nucleus+2*std)
    -----------------
setThreshold(mean+2*std, 255*nz);
makeRectangle(0, 0, 0, 0);
wait(1000);

//-----------------Stores the spot ROI-----------------
waitForUser("Draw the spot ROI then click on Ok");
```

```
roiManager("Add");
roiManager("select", 2);
roiManager("Rename", "Spot");
getStatistics(SpotArea, mean, min, max, std, histogram);
showStatus("");
makeRectangle(0, 0, 0, 0);

selectWindow("Proj");
close();
resetThreshold();

//-----------------GUI-----------------
Dialog.create("Quantif");
Dialog.addNumber("Time intervalle (sec) for pre-bleach", 1);
Dialog.addNumber("Time intervalle (sec) for post-bleach", 5);
Dialog.show;
tPre=Dialog.getNumber();
tPost=Dialog.getNumber();


//-----------------Get raw data-----------------
deltaMax=0;
for (i=1; i<=nSlices; i++){
  selectWindow("Stack");
  setSlice(i);
  time=tPre;
  if(i>nPre) time=tPost;
  setResult("Time (sec)", i-1, (i-1)*time);
  roiManager("select", 0);
  getStatistics(area, mean, min, max, std, histogram);
  setResult("Bkgd", i-1, area*mean);
  roiManager("select", 1);
  getStatistics(area, mean, min, max, std, histogram);
  setResult("Nucleus", i-1, area*mean);
  if(i>1){
    if(mean!=0){
      delta=prevNuc-area*mean;
      if(delta>deltaMax){
        deltaMax=delta;
        tBleach=i-1;
      }
    }
  }
  prevNuc=area*mean;
  roiManager("select", 2);
  getStatistics(area, mean, min, max, std, histogram);
  setResult("Spot", i-1, area*mean);
  updateResults();
}
print("Max bleach found on image "+tBleach+1);
makeRectangle(0, 0, 0, 0);


//-----------------Normalization-----------------
bkgdT0=getResult("Bkgd", 0)/BkgdArea;
nucT0=getResult("Nucleus", 0)-bkgdT0*NucArea;
spotT0=getResult("Spot", 0)-bkgdT0*SpotArea;

run("Duplicate...", "title=[Normalized] duplicate");

for (i=1; i<=nSlices; i++){
  //values bkgd corrected
```

```
  currBkgd=getResult("Bkgd", i-1)/BkgdArea;
  currNuc=getResult("Nucleus", i-1)-currBkgd*NucArea;
  currSpot=getResult("Spot", i-1)-currBkgd*SpotArea;

  setResult("Nucleus bkgd corr-normalized", i-1, currNuc/nucT0);
  setResult("Spot bkgd corr-normalized", i-1, currSpot/spotT0);

  setResult("Spot fold recruitment", i-1, (currSpot*nucT0)/(currNuc*spotT0));
  updateResults();

  setSlice(i);
  run("32-bit");
  run("Subtract...", "slice value="+currBkgd);
  run("Multiply...", "slice value="+nucT0/currNuc);
}
setTool(0);

//----------------Plot Graphs----------------
run("Profile Plot Options...", "width=512 height=512 minimum=0 maximum=0
    interpolate draw");
time=getColumn("Time (sec)", tBleach+1);
nuc=getColumn("Nucleus bkgd corr-normalized", tBleach+1);
spotRaw=getColumn("Spot bkgd corr-normalized", tBleach+1);
spot=getColumn("Spot fold recruitment", tBleach+1);

Plot.create("Nucleus bkgd corr-normalized", "time (sec)", "Intensity (AU)", time,
    nuc);
//Plot.setLimits(time[0], time[time.length-1], 0, 1);
Plot.show();

Plot.create("Spot bkgd corr-normalized", "time (sec)", "Intensity (AU)", time,
    spotRaw);
//Plot.setLimits(time[0], time[time.length-1], 0, 5);
Plot.show();

Plot.create("Spot normalized intensity", "time (sec)", "Intensity (AU)", time,
    spot);
//Plot.setLimits(time[0], time[time.length-1], 0, 5);
Plot.show();

print("----------Fitting results----------");
Fit.logResults;
Fit.doFit("Exponential Recovery", time, spot);
Fit.plot();
print("\n\n----------Analysis of the fitted profile----------\n");
a=Fit.p(0);
b=Fit.p(1);
c=Fit.p(2);
print("Max recruitment: "+a+c);
print("half max recruitment: "+(-log((a+c)/2*a))/b);


//----------Builds a list of the currently opened images----------
function getImageList(){
  nImg=nImages;
  list=newArray(nImg);
  for(i=0; i<nImg; i++){
    selectImage(i+1);
    list[i]=getTitle();
  }
  return list;
}
//----------Returns the column contents as an array of values----------
function getColumn(title, start){
  out=newArray(nResults-start);
  for (i=start; i<nResults; i++) out[i-start]=getResult(title, i);
  return out;
}
```

Title: Radiosensitivity Modulating Factors : Role of PARP-1, PARP-2 and Cdk5 proteins and chromatin implication

Résumé

Les modifications post-traductionnelles des protéines de réparation de l'ADN et des facteurs chromatiniens par poly(ADP-ribose)ylation et par phosphorylation sont essentielles pour le maintien de l'intégrité de l'ADN et de la chromatine, en particulier dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN induits par radiation ionisantes (RI). Parmi les protéines impliquées dans ces deux processus nous trouvons, respectivement, la poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1) et PARP-2, et la kinase dépendante des cyclines Cdk5 : PARP-1 et PARP-2 sont impliqué dans le mécanisme de réparation des cassures simples brin (CSBs) de l'ADN (*Single Strand Break Repair :* SSBR) et la déplétion de Cdk5 a été liée à l'augmentation de la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de PARPs. Nous avons montré, en utilisant des cellules HeLa stablement déplété pour Cdk5 ou PARP-2, que ces deux protéines sont impliquées dans les deux sous-voies du SSBR, *le short-* (SPR) et le *long-patch repair* (LPR). L'absence de Cdk5 ou PARP-2 entraîne des modifications du fonctionnement du SSBR, notamment en termes de recrutement des protéines de réparation PARP-1 et XRCC1, impliquées dans le SPR, et PCNA, protéine clé du LPR, au site du photo-dommage. PARP-2 et Cdk5 agissent aussi sur la balance du niveau des poly(ADP-ribose) car en absence de Cdk5 une hyper-activation de PARP-1 a été montrée, et en absence de PARP-2 une diminution de l'activité de la protéine poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) a été aussi observée. Cependant, malgré ces changements les deux lignées cellulaires dépourvues de Cdk5 ($Cdk5^{KD}$) ou de PARP-2 ($PARP\text{-}2^{KD}$) réparent de façon normale les CSBs radio-induites, mais, intéressement et contrairement aux cellules $PARP\text{-}2^{KD}$, les cellules $Cdk5^{KD}$ sont sensibles à l'effet létal des RI. De plus nous avons montré que Cdk5, PARP-2 et PARG sont toutes les trois impliquées dans la régulation du recrutement et de dissociation du facteur chromatinien ALC1 suggérant leur implication dans la régulation de la dynamique de la chromatine en réponse aux photo-dommages de l'ADN. Ces résultats avec l'observation de la diminution du recrutement de PARP-1 dans les cellules $Cdk5^{KD}$ et $PARP\text{-}2^{KD}$, montrent l'apparition d'un réseau complexe de phosphorylation et de poly(ADP-ribose)ylation en réponse aux RI qui implique Cdk5 , PARP-1,PARP-2 and PARG et qui est fort probablement initié par l'activité kinase de Cdk5.

Mots clés : Cdk5, PARP-1, PARP-2, radiations ionisantes, SSBR, Chromatine.

Summary

The post-translational modifications of DNA repair proteins and histone remodeling factors by poly(ADP-ribose)ylation and phosphorylation are essential for the maintenance of DNA integrity and chromatin structure, and in particular in response to DNA damaging produced by ionizing radiation (IR). Amongst the proteins implicated in these two processes are the poly(ADP-ribose) polymerase -1 (PARP-1) and PARP-2, and the cyclin-dependent kinase Cdk5: PARP-1 and 2 are involved in DNA single strand break (SSB) repair (SSBR) and Cdk5 depletion has been linked with increased cell sensitivity to PARP inhibition. We have shown by using HeLa cells stably depleted for either CdK5 or PARP-2, that the recruitment profile of PARP-1 and XRCC-1, two proteins involved in the short-patch (SP) SSBR sub-pathway, to DNA damage sites is sub-maximal and that of PCNA, a protein involved in the long-patch (LP) repair pathway, is increased in the absence of Cdk5 and decreased in the absence of PARP-2 suggesting that both Cdk5 and PARP-2 are involved in both SSBR sub-pathways. PARP-2 and Cdk5 also impact on the poly(ADP-ribose) levels in cells as in the absence of Cdk5 a hyper-activation of PARP-1 was found and in the absence of PARP-2 a reduction in poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) activity was seen. However, in spite of these changes no impact on the repair of SSBs induced by IR was seen in either the Cdk5 or PARP-2 depleted cells ($Cdk5^{KD}$ or $PARP\text{-}2^{KD}$ cells) but, interestingly, increased radiation sensitivity in terms of cell killing was noted in the Cdk5 depleted cells. We also found that Cdk5, PARP-2 and PARG were all implicated in the regulation of the recruitment and the dissociation of the chromatin-remodeling factor ALC1 from DNA damage sites suggesting a role for these three proteins in changes in chromatin structure after DNA photo-damage. These results, taken together with the observation that PARP-1 recruitment is sub-optimal in both $Cdk5^{KD}$ and $PARP\text{-}2^{KD}$ cells, show that an intricate network of phosphorylation and poly(ADP-ribose)ylation occurs in response to IR that involves Cdk5 , PARP-1,PARP-2 and PARG and that is probably initiated by Cdk5's kinase activity.

Key words: Cdk5, PARP-1, PARP-2, ionizing radiation, single-strand break repair, chromatin

Inserm U612, Institut Curie, Bât 110-112, Centre Universitaire Paris Sud 11, 91405 Cedex