



**HAL**  
open science

# Rôle des modifications de la chromatine dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN et la stabilité génétique

Gemael Cedrick Taty Taty

► **To cite this version:**

Gemael Cedrick Taty Taty. Rôle des modifications de la chromatine dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN et la stabilité génétique. Génétique humaine. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30190 . tel-01865222

**HAL Id: tel-01865222**

**<https://theses.hal.science/tel-01865222>**

Submitted on 31 Aug 2018

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

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



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**  
**TATY TATY Gemaël Cedrick**

**le** mardi 25 octobre 2016

**Titre :**

Rôle des modifications de la chromatine dans la réparation des cassures  
double-brin de l'ADN et la stabilité génétique

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Génétique moléculaire

**Unité de recherche :**

UMR 5088 CNRS/UPS Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire du contrôle de la prolifération

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Yvan CANITROT  
Catherine CHAILLEUX

**Jury :**

Kerstin BYSTRICKY Professeur des universités  
Sophie POLO Chargée de recherche  
Erika BRUNET Chargée de recherche  
Yvan CANITROT Directeur de recherche

# Table des matières

<b>RESUME .....</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>4</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>5</b>
<b>I- INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
I-A- LES SOURCES DE DOMMAGES A L'ADN .....	8
I-A-1- LES SOURCES EXOGENES.....	8
I-A-2- LES SOURCES ENDOGENES.....	9
I-B- MECANISMES DE REPARATION DES CASSURES DOUBLE BRIN DE L'ADN.....	10
I-B-1- LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE .....	12
B-2- JONCTION D'EXTREMITÉ : NHEJ.....	15
B-3- NHEJ-ALTERNATIF .....	18
B-5- PARP DANS LA REPARATION DES DSB.....	19
B-6- CHOIX ENTRE MECANISMES DE REPARATION DES DSB .....	24
I-C- LA CHROMATINE .....	25
C-1- DEFINITION.....	25
1-a- Le nucléosome .....	26
1-b- Les niveaux supérieurs de compaction .....	28
C-2- LES VARIANTS D'HISTONES .....	31
2-a- LES VARIANTS D'HISTONES H2A.....	32
a-1- Le variant H2A.X.....	33
1-i- H2AX dans la réparation des DSB .....	35
a-2- Le variant d'histone H2A.Z .....	36
2-i- H2A.Z dans la transcription .....	37
2-ii- H2A.Z dans la réparation des DSBs.....	37
C-3- LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES.....	40
3-a- L'ACÉTYLATION DES HISTONES DANS LA REPARATION DES DSB.....	40
C-4- LE REMODELAGE DE LA CHROMATINE.....	43
4-a- LA FAMILLE INO80.....	43
4-b- L'ATPase p400 .....	46
b-1- Les caractéristiques structurales de p400.....	48
b-2- La localisation, expression et régulation de p400 .....	48
b-3- L'activité enzymatique de p400 .....	49
b-4- Implication du complexe p400 dans la réparation des DSB.....	50
b-5- Rôle de p400 dans l'apoptose.....	50
b-6- Rôle de p400 dans la sénescence.....	51
b-7- Rôle de p400 dans la prolifération cellulaire .....	52
b-8- Rôle de p400 dans le cancer .....	52
I-D- OBJECTIFS DE LA THESE.....	54
<b>II-RESULTATS .....</b>	<b>55</b>
II-A-ARTICLE 1: H2A.Z DEPLETION IMPAIRS PROLIFERATION AND VIABILITY BUT NOT DNA DOUBLE-STRAND BREAKS REPAIR IN HUMAN IMMORTALIZED AND TUMORAL CELL LINES.....	55
A-1-Introduction .....	55
A-2-Résultats expérimentaux .....	56
Conclusion.....	58
II-B-ARTICLE 2: CONTROL OF ALTERNATIVE END JOINING BY THE CHROMATIN REMODELER P400 ATPASE .....	59
B-1-Introduction .....	59
B-2-Résultats expérimentaux.....	60
Conclusion.....	61
<b>III-DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>62</b>
III-A H2AZ: DES RESULTATS EN DESACCORD AVEC LA LITTERATURE.....	62
- siRNA vs ShrRNA .....	62
- Recrutement de H2A.Z aux cassures .....	62
- Mutation de H2A.Z.....	63

-	<i>Choix des substrats de réparation: cas du NHEJ</i> .....	64
-	<i>Voie RH</i> .....	64
-	<i>I-SceI: expression stable/inductible</i> .....	64
-	<i>Les variants de H2A.Z</i> .....	65
-	<i>La SUMOylation de H2A.Z</i> .....	66
III-B-	L'ATPASE P400 COMME GARDIEN DE LA STABILITE DU GENOME. ....	66
-	<i>Interactions de p400 avec les acteurs de la réparation</i> .....	67
-	<i>p400 inhibe l'induction des aberrations chromosomiques</i> .....	67
III-C-	L'ATPASE P400 CONTROLE LA REPARATION DES DSBs PAR NHEJ .....	68
-	<i>Le domaine ATPase de p400</i> .....	69
-	<i>p400 et NHEJ alternatif</i> .....	69
-	<i>La résection des DSB</i> .....	69
-	<i>Le NHEJ alternatif remplace le NHEJ et la RH</i> .....	70
-	<i>p400 et tumorigenèse</i> .....	70
<b>IV-</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>73</b>
<b>V-</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>81</b>

## RESUME

Le génome humain est constamment la cible d'agents qui endommagent l'ADN. Ces dommages sont multiples et variés tels que les cassures simple et double brin (DSB). Les DSBs sont des lésions très toxiques dont l'origine peut être multiple. Les cellules de mammifères réparent les DSBs en utilisant deux mécanismes principaux, la recombinaison homologe (RH) qui est dépendante du cycle cellulaire et utilise la chromatide sœur comme matrice de réparation et la jonction des extrémités non homologues (NHEJ) qui est indépendante du cycle cellulaire et consiste en la ligation des extrémités d'ADN endommagées. Cette réparation a lieu dans un contexte chromatinien qui nécessite un dynamisme pour rendre accessible les sites lésés aux différentes machineries de réparation. Lors de mes travaux, j'ai étudié le remodeleur de la chromatine p400 ainsi que le variant d'histone H2A.Z qui sont deux protéines impliquées dans la dynamique de la chromatine, afin de comprendre leur rôle dans les mécanismes de réparation des DSBs et la stabilité du génome. p400, une ATPase de la famille SWI2/SNF2 participe à l'incorporation du variant d'histone H2A.Z dans la chromatine. Au cours de ma thèse, j'ai montré que la déplétion par siRNA du variant d'histone H2A.Z, dans la lignée d'ostéosarcome humain (U2OS) et dans des fibroblastes humains immortalisés, n'a pas d'effets sur la réparation des DSBs. Ces résultats sont corrélés avec une absence de recrutement de H2A.Z au niveau des cassures après étude par micro irradiation laser ou par immunoprécipitation de chromatine. Cependant, la déplétion de H2A.Z affecte la prolifération cellulaire en influençant l'efficacité de clonage et le cycle cellulaire. L'autre partie de mes travaux a mis en évidence que l'ATPase p400 est un frein à l'utilisation de la voie alternative de jonction des extrémités (alt-EJ) qui est un processus de réparation des DSBs très mutagène. L'augmentation des événements du NHEJ-Alternatif et la génération d'instabilité génétique observés lors de la déplétion de p400 par siRNA semblent tributaires de la résection des DSBs par CtIP. Ces résultats indiquent que p400 joue un rôle post-résection dans les étapes plus tardives de la RH. De plus, la déplétion de p400 conduit au recrutement de la polyADP ribose polymérase (PARP) et de l'ADN ligase 3 à la DSB, ce qui provoque la mort sélective de ces cellules lors d'un traitement par des inhibiteurs de PARP. Ces résultats montrent que P400 agit comme un frein pour empêcher l'utilisation du NHEJ-Alternatif et donc l'instabilité génétique.

Mots clés: chromatine, H2A.Z, p400, réparation de l'ADN, épigénétique, Cancer

## SUMMARY

The human genome is constantly targeted by DNA damaging agents. These damages are many and varied, such as single and double strand breaks (DSBs). The DSB are highly toxic lesions whose origin can be multiple. Mammalian cells mainly use two DNA repair pathways to repair DSB, homologous recombination (RH), which is dependent on the presence of the intact homologous copy (the sister chromatid) and on the cell cycle stage and the non-homologous end joining (NHEJ) pathway, which is cell cycle independent and performs direct ligation of the two DNA ends. The repair of DNA damage takes place in a chromatin context that needs to be remodeled to give access to damaged sites. During my work, I studied the chromatin remodeler p400 and the histone variant H2A.Z both involved in chromatin remodeling, to understand their role in DSB repair and genome stability. p400, an ATPase of the SWI2/SNF2 family is involved in the incorporation of H2A.Z in chromatin. I have shown that H2A.Z depletion in the osteosarcoma cell line U2OS and in immortalized human fibroblasts did not alter DSB repair. These results are correlated with the lack of H2A.Z recruitment at DSB observed after local laser irradiation or Chromatin Immunoprecipitation. However, H2A.Z depletion affects cell proliferation and the cell cycle distribution. In addition, I have shown that the chromatin remodeler p400 is a brake to the use of alternative End Joining (alt-EJ) which is a highly mutagenic repair process. The increase in alt-EJ events observed in p400-depleted cells is dependent on CtIP-mediated resection of DNA ends. Moreover, p400 depletion leads to the recruitment of poly(ADP) ribose polymerase (PARP) and DNA ligase 3 at DSB, leading to selective cell killing by PARP inhibitors. Altogether these results show that p400 acts as a brake to prevent alt-EJ dependent genetic instability and underline its potential value as a clinical marker.

Key words: chromatin, H2A.Z, p400, DNA repair, Epigenetics, Cancer.

## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier tout d'abord l'ensemble des membres du Jury d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à ma soutenance.

Je voudrais remercier Didier TROUCHE pour m'avoir accueilli au sein de son équipe «Chromatine et Prolifération Cellulaire» et m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie tout particulièrement Yvan et Cathy pour m'avoir accompagné tout au long de ces 4 années de labeur. Yvan, pour ton excellence scientifique, ta disponibilité, ton enthousiasme sans faille, ta force de conviction en tous moments et ton soutien en toutes circonstances, Cathy, pour ta présence rassurante lors des expériences, ton apport technique très déterminant, pour tes conseils précieux, ton amitié et ton soutien en toutes circonstances.

Je remercie sincèrement les organismes suivants qui ont financés ma thèse, le gouvernement du Gabon de m'avoir accordé une bourse d'étude, Campus France pour la gestion de ma bourse et les facilités de logement, enfin la Ligue contre le Cancer pour le financement de ma quatrième année de thèse.

Je remercie Muriel pour m'avoir appris à utiliser le cytomètre en flux qui a été un outil très utile au cours de ma thèse. Je remercie sincèrement Gaëlle et toute son équipe pour l'apport déterminant en matériels et méthodes au cours de ma thèse.

Très sincère remerciement à Pascale et Florence pour leur participation à mes travaux lors des comités de thèse.

Merci du fond du cœur à tous les membres de l'équipe Trouche, passés et présents. J'ai passé 4 années plus que sympathiques et enrichissantes en votre compagnie. Je recommande chaleureusement cette équipe à tout étudiant qui souhaiterait faire une thèse. Merci tout spécialement à Virginie pour ta disponibilité, Fabrice pour ton apport informatique et ta présence. Merci à Martine pour les kits des expériences, à Marie, Estelle et Lisa pour leur présence. Merci à tous les étudiants qui sont passés par le laboratoire au cours de ma thèse, je pense tout particulièrement à Alexandre, Camille, Jérémie, Aude, Kader, Lucie, Maharshi, Sandra.

Merci à mes amis, frères et sœurs, pour leur présence, particulièrement à Clève, Stéphane, Keke, Odilon, tonton Josué, Amel, Mouss, Chady, Leity, Patricia, Aymard, Carène, Rondo, Déotte, Aude, Raïssa. Je remercie ma fille Maëlle pour sa bonne humeur. Il te revient à toi Maëlle de faire les études mieux que moi. Grace, ces dernières lignes te reviennent de droit, pour ta présence, ton soutien durant toutes ces années.

## ABREVIATIONS

53BP1 : p53-Binding Protein 1  
ACF : ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor  
ADN : acide désoxyribonucléique  
E1A : Adenovirus early region 1A  
AID : Activation-Induced cytidine Deaminase  
AIRE : AutoImmune REgulator  
A-NHEJ : Alternative-NHEJ  
APLF : Aprataxin and PNK-like factor  
ATM : Ataxia telangiectasia mutated protein  
ATP : Adenosine Triphosphate  
ATR : Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3-related protein  
BER Base Excision repair = réparation par excision de base  
BLM : Bléomycine  
B-NHEJ : backup non-homologous end joining  
BRCA1 : Breast Cancer susceptibility protein 1  
BRCT : BRCA1 C-terminal  
BrdU : Bromodéoxyuridine  
Cdk2 : Cycline dependent kinase 2  
ChIP : immunoprécipitation de chromatine  
CHK2 : Checkpoint kinase 2  
CHD : Chromodomain helicase DNA-binding protein  
C-NHEJ : NHEJ canonique  
CO : Crossing Over  
CtIP : C-terminal binding protein (CtBP)-interacting protein  
DBD : DNA Binding Domain  
DDR : Réponse aux dommages à l'ADN = DNA damage response  
DNA-PK : DNA-dependent protein kinase  
DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase catalytic subunit  
DSB : Double-Strand Break  
EJ : activité de ligature des extrémités d'une CDB (End Joining)  
ES : cellules souches embryonnaires (Embryonic Stem)  
FA : Fanconi Anemia  
FAT : FRAP, ATM, TRRAP



FHA : Forkhead-associated domain  
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching  
GFP : Green Fluorescent Protein  
H2AX : variant X de l'histone 2A  
H2A.Z : variant Z de l'histone 2A  
HAT : histone acétyltransférase  
HCC : hepatocellular carcinoma  
HDAC : Histone deacetylase  
HRDC : Helicase Related Domain  
INO80 : Inositol-requiring protein 80  
I-SceI : Intronique *Saccharomyces cerevisiae* endonuclease I  
  
ISWI : Imitation SWItch  
KAP1 : KRAB-associated protein 1  
kb : kilobases  
kDa : kilo Dalton  
KMT : lysines méthyltransférases  
Lig4 : DNA ligase IV  
MDC1 : Mediator of DNA Damage Chekpoint 1  
Mre11 : Meiotic recombination protein 11  
MRN : Mre11, Rad50, Nbs1  
MRX : Mre11, Rad50, Xrs2  
Nbs1 : Nijmegen Breakage Syndrome protein 1  
NHEJ : Non-Homologous End-Joining = jonction d'extrémités non homologues  
NLS : domaine de localisation nucléaire  
PARP1 : poly (ADP-ribose) polymerase 1  
pb : paire de bases  
PI3K : phosphatidylinositol-3 kinases  
PIKK : PI3K-like kinases  
Rad50 : Radiation sensitivity abnormal 50  
  
Rad51 : Radiation sensitivity abnormal 51  
Rad52 : Radiation sensitivity abnormal 52  
RAG-1 et RAG-2 : Recombinaison Activating Gene 1 et 2  
RAP80 : Receptor Associated Protein 80

RCC : Renal cell carcinoma

RH : Recombinaison Homologue

RI : rayonnements ionisants

RNF : ring finger protein

ROS : reactive oxygen species

RPA : Replication protein A

RSS : Recombinaison Sequence Signal

SAF-A : Scaffold Attachment Factor A

SAP : SAF-A/B, Acinus and PIAS

siRNA : small interference RNA

shRNA : short hairpin RNA

SMARCA1 : SWI-SNF-related Matrix-associated Actin-dependent Regulator of Chromatin

A1

SSA : dégradation hybridation (Single Strand Annealing )

SSB : Cassure simple brin de l'ADN

SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier

SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non Fermentable

Tip60 : tat interactive protein 60

TRF1 et TRF2 : Telomere Repeat Factor 1 et 2

TRRAP : Transactivation/tRansformation domain-Associated Protein

UV : Ultra Violet

WRN : Werner syndrome mutated protein

XLF : XRCC4-like factor

XRCC1 : X-Ray sensitivity Cross Complementing group 1

XRCC4 : X-Ray sensitivity Cross Complementing group 4

# **I- INTRODUCTION**

## **I-A- LES SOURCES DE DOMMAGES A L'ADN**

Le génome humain subit constamment des dommages. Il a été estimé que plus de 10 000 lésions sont spontanément générées dans les cellules de mammifères par jour (Lindahl, 1993). Ces dommages peuvent être d'origine endogène (le métabolisme cellulaire, l'effondrement de la fourche de réplication, l'alkylation des bases) ou environnementale (radiations ionisantes (IR), les radiations (UV), agents chimio thérapeutiques). Les dommages à l'ADN sont nombreux et variés (cassures double-brin, simple-brin, pontages, adduits plus ou moins encombrants...). Parmi les dommages à l'ADN, je me suis particulièrement intéressé aux cassures double-brin (DSB) qui sont des lésions très délétères pour la cellule. D'une façon générale, les lésions de l'ADN sont un obstacle majeur aux fonctions cellulaires. Certaines de ces lésions interfèrent avec la fourche de réplication et causent des mutations ou bien perturbent la transcription affectant l'expression génique et la physiologie cellulaire. Mes travaux se sont focalisés sur la réparation des DSB, c'est pourquoi dans la suite du manuscrit j'évoquerai seulement ce type de dommages à l'ADN.

### **I-A-1- LES SOURCES EXOGENES**

De nombreux agents physiques et chimiques peuvent générer directement ou indirectement des DSB (Hoeijmakers, 2009). Parmi ceux-ci les radiations ionisantes (rayons X, rayons gamma). Les radiations peuvent provoquer directement des DSB mais également produire des radicaux libres qui peuvent générer des modifications de bases, des cassures simple-brin qui à leur tour peuvent dégénérer en DSB. Les DSB peuvent également être produits par des agents génotoxiques comme les agents radiomimétiques. Parmi ces molécules, on peut citer la bléomycine (BLM), la néocarzinostatine (NCS) et la Calichéamicine (Cali). Les DSB peuvent également être produits par les inhibiteurs d'ADN topoisomérases. En effet, les topoisomérases sont essentielles pour la résolution des contraintes topologiques de la double hélice d'ADN lors des processus comme la réplication, la recombinaison, la transcription et la ségrégation chromosomique (Ashour et al., 2015). En fonction de leur mode de clivage, elles sont classées en deux groupes, les topoisomérases de type I, qui coupent un seul des deux brins de l'ADN et les topoisomérases de type II qui induisent une DSB. Les inhibiteurs des topoisomérases permettent de bloquer ces réactions enzymatiques. Certains inhibiteurs comme la camptothécine et l'étoposide agissent en stabilisant respectivement les complexes clivables

ADN/topo1 et ADN/topo2. Ces complexes ADN-topoisomérases, bien que réversibles sont susceptibles d'être transformés en dommage à l'ADN. Ainsi, après traitement à la camptothécine, l'ADN polymérase répliquative peut entrer en collision avec le complexe ADN/topo1 et générer une extrémité double-brin sur le brin continu et une SSB sur le brin discontinu sur laquelle la topo1 reste fixée.

### **I-A-2- LES SOURCES ENDOGENES**

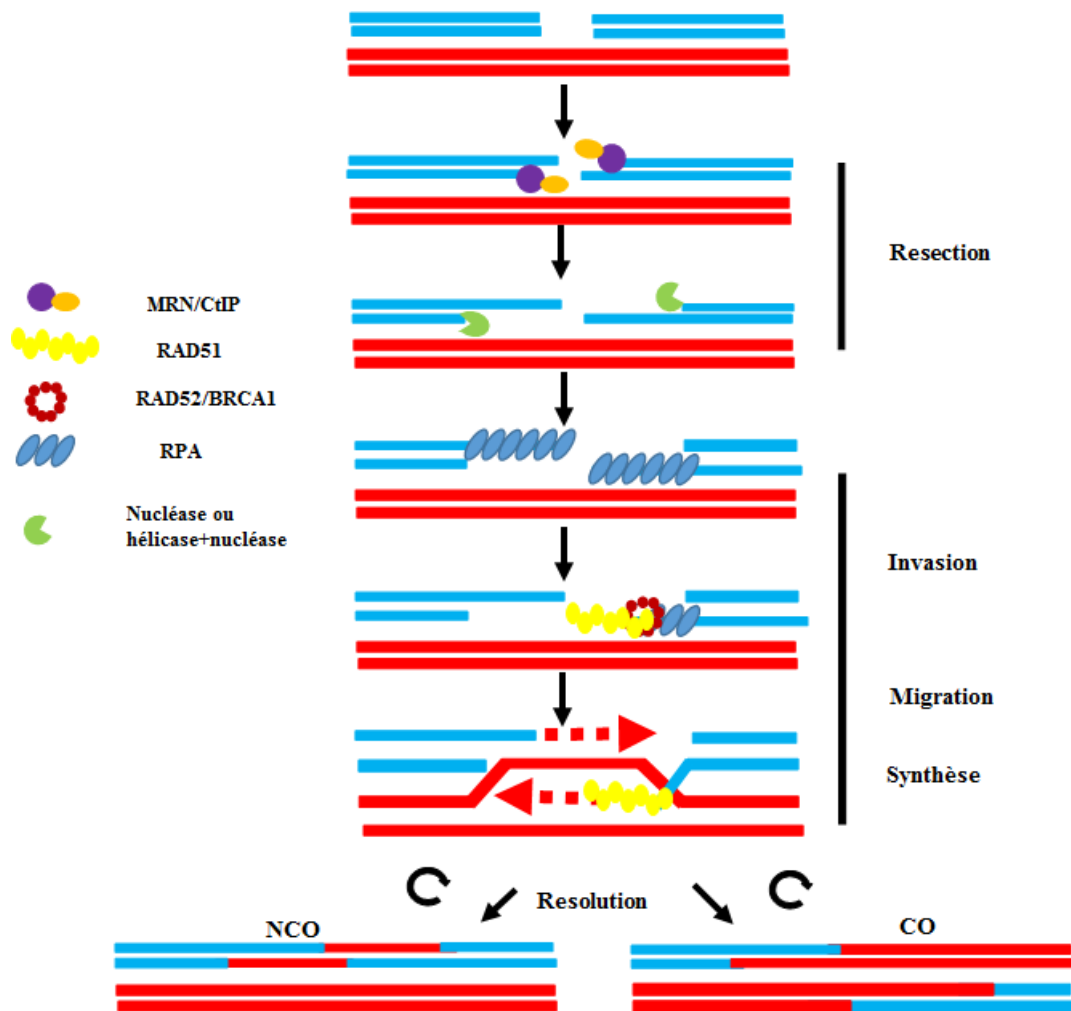
Les DSB peuvent également avoir une origine endogène contrôlée ou non par la cellule. Par exemple au niveau physiologique, lors de la reproduction sexuée, la recombinaison méiotique est initiée par la formation de nombreuses cassures de l'ADN (Lam and Keeney, 2015). Elle permet le brassage de l'information génétique (par la génération de crossing over) et la répartition équilibrée des chromosomes parentaux lors de la formation des gamètes. Elle est initiée par la formation d'un très grand nombre de DSB chromosomique. Depuis la fin des années 1990, il est communément admis que leur formation est catalysée par une protéine spécifique, SPO11 (de Massy, 2013). Une autre source physiologique de DSB est la génération du répertoire immunitaire. Celle-ci a lieu dans certains tissus et en particulier le tissu lymphoïde où l'expression de certaines endonucléases telles que les protéines RAG peut être à l'origine des DSB. Dans certains cas, les DSB peuvent être programmées au cours de processus tels que la recombinaison V(D)J (Roth, 2014) ou la commutation isotypique (Rocha et al., 2016).

Enfin, la réplication de l'ADN est l'une des sources endogènes les plus importantes pour la génération des DSB. Lorsque la machinerie de réplication rencontre une lésion simple brin d'origine endogène ou exogène, la progression de la fourche de réplication peut être bloquée, ce qui peut induire une cassure sur le brin porteur du dommage et peut se traduire par une rupture de l'une des chromatides sœurs (Kogoma, 1997).

Il existe également une génération de DSB qui peut être qualifiée d'accidentelle qui résulte du métabolisme cellulaire. Les organismes aérobies, tel que l'homme, ont un métabolisme qui est dépendant de l'oxygène. En effet, ce dernier est impliqué dans de nombreuses réactions chimiques qui sont génératrices de chaleur et d'énergie (principalement dans les mitochondries). Toutefois, 1 % de l'oxygène respiré échappe aux chaînes de production et va se réduire de façon incomplète pour se transformer en espèces réactives de l'oxygène (ROS). Par leur nature radicalaire, les ROS représentent une menace potentielle pour l'ADN (Lindahl, 1993) car ils peuvent conduire à des lésions oxydatives de bases ou de sucres, à l'apparition de sites abasiques, conduisant ensuite à la génération de SSB et de DSB

## **I-B- MECANISMES DE REPARATION DES CASSURES DOUBLE BRIN DE L'ADN**

Mes travaux se sont focalisés sur la réparation d'un type de dommages à l'ADN, les cassures double-brin. C'est pourquoi je décrirai uniquement les systèmes de réparation qui prennent en charge ce type de dommage. Les cellules eucaryotes utilisent deux mécanismes majeurs pour réparer les DSB, la recombinaison homologue (RH) et la jonction des extrémités (NHEJ) (Ceccaldi et al., 2016).



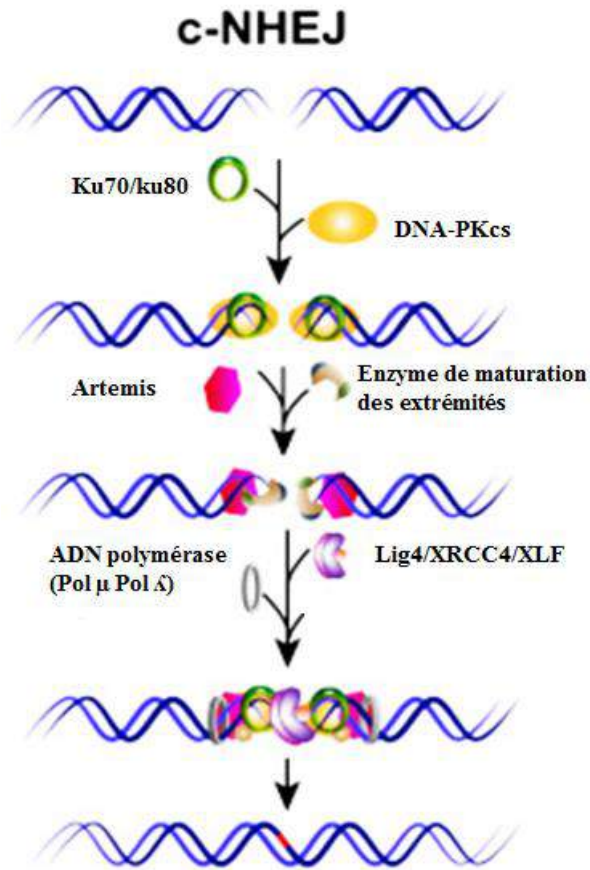
**Figure 1** : Le mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue (RH) (Tham et al., 2016). Suite à l'induction des DSB par les agents endommageant l'ADN, la RH commence par le processus de résection initié par le complexe MRN/CtIP, puis les extrémités sont prises en charge par les nucléases et/ou les hélicases, pour créer des extrémités 3' sortantes d'ADN simple brin. Ces extrémités d'ADN sont d'abord stabilisées par des facteurs tels que RPA qui permet le recrutement de RAD52-BRCA2 pour faciliter la formation du filament de RAD51. La formation d'un filament de nucléoprotéine par RAD51 sur l'ADN simple brin, permet l'envahissement du brin homologue et la synthèse d'ADN. L'étape de résolution peut conduire à la formation des croisements appelés, crossing over (CO) ou à une résolution sans crossing over (NCO).

## **I-B-1- LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE**

Parmi les mécanismes de réparation des DSB, la RH est un processus qui permet une réparation fidèle de nombreux dommages à l'ADN, notamment les DSB (Figure 1). La RH participe à la préservation de l'intégrité génomique, au maintien de la structure des télomères (Acharya et al., 2014) et joue un rôle important dans la réplication (Michl et al., 2016; Northall et al., 2016). La RH est un processus qui se déroule en trois phases. La première phase, appelée phase présynaptique, se caractérise par le fait que la DSB est prise en charge par des enzymes (nucléases) qui génèrent de l'ADN simple brin sur lequel des protéines comme la recombinaise RAD51 peuvent se charger et former un nucléo-protéofilament appelé filament présynaptique. D'une façon générale, suite à l'induction de la DSB, le contrôle et la prise en charge des extrémités de la cassure est l'évènement majeur qui détermine le choix de la voie de réparation. Au cours de la phase présynaptique, la RH commence par une étape de résection du brin 5' ce qui permet de générer une extrémité 3' d'ADN simple brin. Cette résection a lieu grâce à des protéines qui possèdent une activité endo- et exo-nucléase, parmi lesquelles MRE11 et CtIP (Lavin, 2004; Sartori et al., 2007). Il existe d'autres mécanismes qui conduisent à la résection du brin 5'. Les extrémités d'ADN peuvent aussi être déroulées et dégradées au niveau de la queue 5' résultante, via l'action combinée des hélicases de la famille RecQ (BLM ou WRN) et la nucléase DNA2. On peut avoir également une dégradation du brin 5' directement à partir de l'ADN double brin par un mécanisme qui fait intervenir l'exonucléase EXO1 (Gravel et al., 2008; Nimonkar et al., 2011). Suite à l'induction de la résection, l'extrémité simple brin restante est prise en charge par RPA, un complexe hétéro-trimérique composé de trois protéines RPA1, 2 et 3 qui sert à stabiliser la molécule d'ADN simple brin (Braun et al., 1997). La recherche d'homologie des séquences nécessite le remplacement de RPA par d'autres facteurs spécifiques comme la recombinaise RAD51. Toutefois, comme l'affinité de RPA pour l'extrémité simple brin est supérieure à celle de RAD51, l'intervention d'autres protéines comme RAD52 et BRCA2 est nécessaire pour faciliter le déplacement de RPA et le chargement de RAD51. La phase synaptique est l'une des principales étapes de la RH. Au cours de cette phase, le filament recherche puis envahit la séquence homologue. Cette invasion de séquence homologue génère la D-loop, une boucle d'ADN dans laquelle l'extrémité 3' est utilisée comme point de départ pour la synthèse d'ADN à partir de la molécule envahie. La phase post-synaptique, aussi appelée phase de résolution de la D-loop, est l'étape de génération de l'ADN néo-synthétisé à partir de la séquence homologue envahie. Au cours de cette étape, la deuxième extrémité simple brin est engagée dans la D-loop, soit par une invasion indépendante soit par capture de la deuxième extrémité grâce à la protéine RAD52. La synthèse

d'ADN par des polymérase (principalement la polymérase delta), est suivie d'une étape de ligation, pour obtenir une structure finale appelée, double Jonction de Holliday (dHJ). Cette Jonction de Holliday peut être résolue par deux mécanismes (Figure 1). Le mécanisme qui utilise des nucléases comme MUS81-EME1, GEN1 ou encore la resolvase A. Dans cette voie, en fonction de leurs activités, la Jonction de Holliday peut conduire soit à un crossing over (échange important de matériel) soit à de la conversion génique (échange limité de matériel) (Heyer, 2004). L'autre mécanisme de résolution des Jonctions de Holliday passe par le complexe formé par la topo-isomérase TOPOIII- $\alpha$  et l'hélicase BLM. BLM permet la migration des deux jonctions l'une vers l'autre et TOPOIII- $\alpha$  sépare les deux duplex. Cette résolution conduit à un produit sans crossing-over, différent de la conversion génique et à un échange de matériel limité entre les deux molécules d'ADN (Raynard et al., 2006). Une part importante des Jonctions de Holliday semble être résolue par le complexe BLM/TOPOIII- $\alpha$  puisque dans un contexte déficient en BLM, on observe une augmentation drastique du nombre de crossing-over après induction de dommages (Wu and Hickson, 2003). La RH est principalement active dans les phases S et G2 du cycle, phases au cours desquelles la copie homologue est présente et sert de matrice (Thompson and Schild, 2002) .





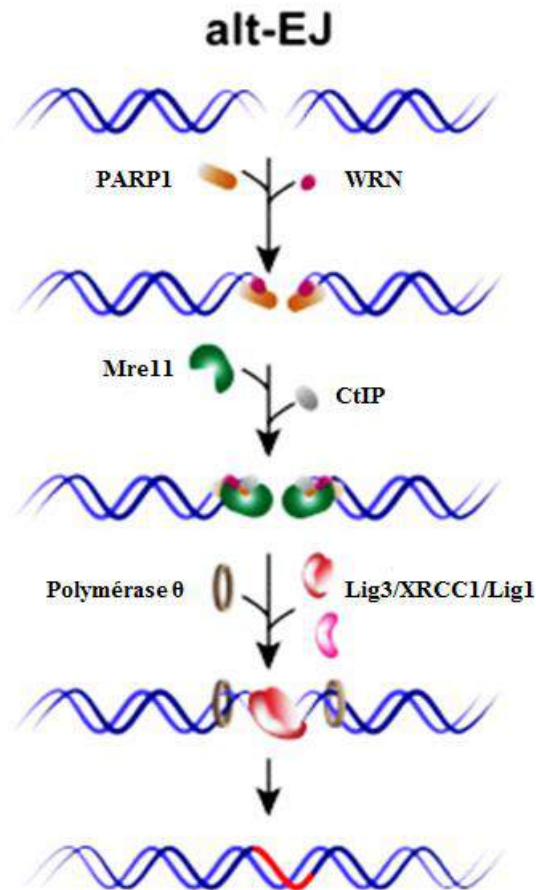
**Figure 2** : Mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN par NHEJ classique (Iliakis et al., 2015). Suite à l'induction des DSB, l'hétérodimère Ku70/80 se fixe aux extrémités endommagées pour les stabiliser et favoriser le recrutement de la kinase DNA-PKcs. Le mécanisme se poursuit par le chargement de nucléases (Artemis) qui interviennent dans la maturation des extrémités. Le mécanisme prend fin par l'intervention d'ADN polymérase pour la synthèse de quelques nucléotides et la ligation qui fait intervenir un complexe contenant la ligase 4 et XRCC4.

## **B-2- JONCTION D'EXTREMITÉ : NHEJ**

La voie de réparation des DSB par jonction des extrémités non homologues, appelée NHEJ (Non Homologous End Joining) est indépendante du cycle cellulaire et permet de relier directement les deux extrémités endommagées. Le NHEJ est la voie majeure de réparation des DSB dans les cellules mammifères. Ce mécanisme commence par le chargement de l'hétérodimère Ku 70/80 à l'extrémité endommagée, suivi du recrutement de la kinase DNA-PKs avec son activité d'auto-phosphorylation et de phosphorylation d'autres protéines (Weterings et al., 2003). La ligation des extrémités compatibles (NHEJ classique) se fait grâce à l'intervention du complexe Ligase IV/XRCC4 et ses cofacteurs comme XLF qui participent à l'efficacité de la réparation (Ahnesorg et al., 2006). Bien que cette voie soit globalement fidèle, elle peut également être source d'erreurs de réparation. En effet, dans des cellules de souris, il a été montré que les facteurs du NHEJ canonique comme l'ADN ligase IV (LIG4) inhibent la génération des translocations, alors que chez l'homme, le défaut de ce même facteur (LIG4), entraîne une diminution de la fréquence d'apparition des translocations (Ghezraoui et al., 2014). Toutefois, il peut arriver que les extrémités de la cassure ne soient pas compatibles. Dans ce cas, la réparation par NHEJ peut impliquer de nombreuses enzymes qui permettent de rendre les extrémités propres à la ligation. Cette seconde voie, qui est dite de « substitution » reste exceptionnelle pour son utilisation et délétère pour l'information génétique. La détection et la prise en charge des extrémités est la première étape du NHEJ classique. Au cours de cette étape, l'hétérodimère Ku70/80 avec sa structure en forme d'anneau se lie spécifiquement aux extrémités libres d'ADN et coulisse sur l'ADN (Walker et al., 2001). L'anneau est formé par les extrémités N-terminales de Ku70 et Ku80, mais leurs extrémités C-terminales ont des rôles différents. L'extrémité de Ku70 permet la liaison à l'ADN via le domaine SAP (Aravind and Koonin, 2000). Tandis que, celle de Ku80 serait responsable du recrutement de la DNAPK en présence d'une extrémité d'ADN (Gell and Jackson, 1999; Singleton et al., 1999). Cependant un tel mécanisme de recrutement de DNAPK reste débattu, puisque la perte de la partie N-terminale de Ku80 n'affecte pas le recrutement de DNAPK (Weterings et al., 2009). Le complexe DNAPK/Ku70-80, une fois assemblé, acquiert la capacité de phosphoryler de nombreuses cibles (comme la sérine 139 de H2A.X) et de nombreux sites d'auto-phosphorylation (Costantini et al., 2007). Il a été montré que suite à l'induction des dommages à l'ADN, DNA-PK induit la phosphorylation de XRCC4 sur la Ser320 (Sharma et al., 2016). Bien que la fonction de phosphorylation soit primordiale pour la réparation par NHEJ, les rôles exacts de ces phosphorylations au niveau de la Ser320 restent encore à éclaircir.

La deuxième étape de la réparation par NHEJ est la maturation des extrémités. Au cours de cette étape, des enzymes rendent les extrémités compatibles à la réparation. Parmi les dommages à l'ADN, les radiations ionisantes, peuvent générer des extrémités endommagées non directement ligables. La modification de ces extrémités non joignables peut impliquer de nombreuses enzymes comme des phosphatases, des kinases, ou des nucléases telles que EXO1, MRE11, Artémis et WRN (Kusumoto et al., 2008; Weterings et al., 2009; Xie et al., 2009). De plus, il peut être nécessaire, dans certains cas, de re-synthétiser quelques nucléotides par des ADN polymérases ( $\lambda$  et  $\mu$ ) (Capp et al., 2007; Lee et al., 2004). Il faut noter que toutes ces modifications des extrémités peuvent conduire à la perte ou la modification de nucléotides et donc à la génération d'instabilité génétique.

Enfin, la ligation est l'étape finale du NHEJ. Au cours de cette étape, le complexe multiprotéique, XRCC4/XLF-Cernunnos/ADN Ligase IV, effectue la ligation des extrémités endommagées (Figure 2). Le défaut des protéines XRCC4 ou ADN Ligase IV est létal chez la souris et le complexe multiprotéique de ligation est nécessaire pour l'efficacité de la réparation par NHEJ (Barnes et al., 1998). Bien que XRCC4 n'ait pas d'activité catalytique, il joue un rôle essentiel dans la NHEJ grâce à sa capacité à interagir avec l'ADN Ligase IV. La protéine XRCC4 interagit aussi avec XLF (ou Cernunnos) mais la fonction de ce complexe n'est pas complètement comprise (Ropars et al., 2011). Le complexe XRCC4/XLF intervient dans l'étape de ligation lors du processus de réparation par NHEJ. Pour être active la Ligase IV a besoin de XRCC4, notamment pour garantir sa stabilité et un bon adressage aux cassures (Bryans et al., 1999; Drouet et al., 2005). Cependant le complexe XLF/XRCC4 aurait aussi un rôle dans les étapes précoces du NHEJ, indépendamment de l'ADN Ligase IV, en protégeant et en alignant les extrémités clivées (Mahaney et al., 2013).



**Figure 3 :** Mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN par NHEJ-Alternatif (Iliakis et al., 2015). Suite à l'induction des DSB, le NHEJ-Alternatif débute par le chargement rapide de PARP1 qui se fixe aux extrémités endommagées, puis par l'hélicase WNR (Werner syndrome ATP-dependent helicase). Le mécanisme se poursuit par le chargement des nucléases qui interviennent dans les processus de maturation des extrémités de l'ADN lors de la résection. Le mécanisme prend fin par l'intervention des polymérases et la ligation qui fait intervenir un complexe protéique contenant la ligase 3 et XRCC1.

### **B-3- NHEJ-ALTERNATIF**

Le NHEJ-Alternatif (Alternative-NHEJ), encore appelé MMEJ (Microhomology Mediated End Joining), ou B-NHEJ (Back-up NHEJ) est un mécanisme qui fonctionne lorsque le NHEJ classique est défectueux. En effet, on observe une activité résiduelle de réparation par jonction d'extrémités dans des cellules déficientes pour les facteurs majeurs du NHEJ classique comme Ku70/80, ADN Ligase IV ou XRCC4 (Bennardo et al., 2008; Wang et al., 2003). La voie du NHEJ alternatif utilise ou non des séquences de micro-homologie de part et d'autre de la cassure pour opérer la réparation. Plusieurs travaux ont rapporté l'implication de PARP1 dans la réparation des DSB par NHEJ-Alternatif (Audebert et al., 2004; Mansour et al., 2010; Soni et al., 2014). Ces travaux montrent l'existence d'une voie de réparation des DSB qui est dépendante de PARP1 et de l'ADN ligase 3. PARP1 est un senseur des dommages connu pour influencer le recrutement du complexe MRN, il est impliqué dans la réparation des cassures simple brin pour lesquelles il permet le recrutement du complexe XRCC1/DNALig3 (El-Khamisy et al., 2003; Haince et al., 2008). PARP-1 pourrait donc permettre le recrutement des complexes de résection et de ligation. Le mécanisme de NHEJ-Alternatif passe ensuite par une étape de résection qui est plus ou moins longue et qui fait intervenir des protéines telles que CtIP et le complexe MRN, puisque leur déplétion dans un contexte XRCC4-déficient conduit à une diminution de la jonction d'extrémités (Rass et al., 2009). Cette étape de résection est contrôlée par 53BP1 et BLM. En effet, la déplétion de BLM induit une augmentation des délétions qui reflètent la réparation par NHEJ-Alternatif (Grabarz et al., 2013). Il faut noter que la nucléase Artémis est également impliquée dans la réparation des DSB par NHEJ-Alternatif (Moscariello et al., 2015). Une fois la résection et l'association par homologie effectuée, la ligation se fait grâce au complexe XRCC1/DNALig3 probablement recruté par l'intermédiaire de PARP1 (Figure 3). Le NHEJ-Alternatif est un processus de réparation très contrôlé, conduisant à des remaniements génétiques importants et potentiellement dangereux puisque la séquence d'ADN située entre les deux séquences d'homologie est perdue. La RH et le NHEJ sont privilégiés pour les DSB génomiques « classiques » où le NHEJ-Alternatif est surtout un mécanisme de secours du NHEJ classique quand l'un de ses facteurs est absent, mais aussi de la RH quand la réparation est bloquée après l'étape de résection, empêchant la C-NHEJ (Soni et al., 2015). Cependant, certains rôles spécifiques ont été attribués au mécanisme de réparation par Alt-NHEJ. Ce dernier a été impliqué dans la réparation des DSB endogènes produit pendant le CSR (Class Switch Recombination) dans les lymphocytes B, mais aussi dans la formation de translocations (Simsek and Jasin, 2010; Soni et al., 2014; Yan et al., 2007).

## **B-5- PARP DANS LA REPARATION DES DSB**

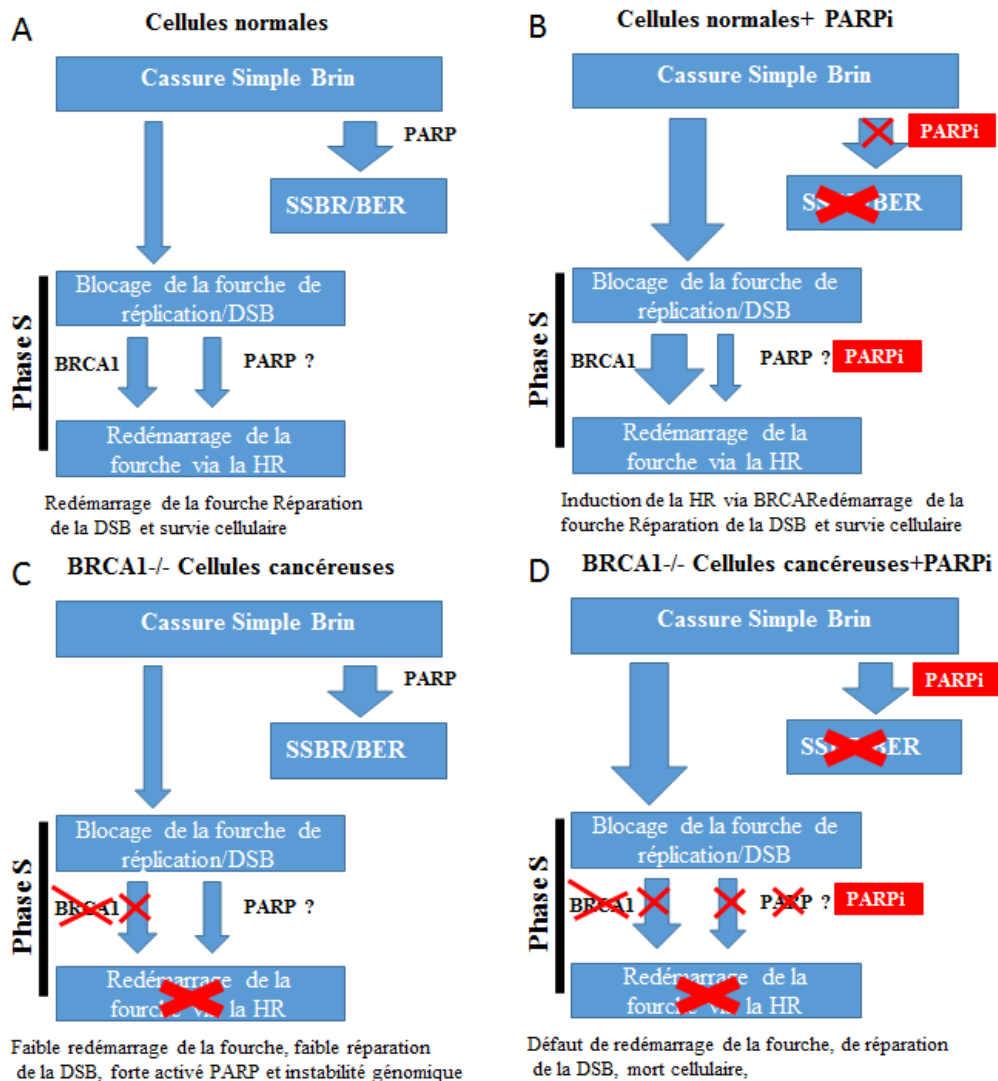
Les cellules de mammifères répondent très rapidement aux différents types de dommages à l'ADN par l'activation d'une enzyme nucléaire abondante, la poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1) (Hakme et al., 2008). PARP permet la synthèse d'une chaîne de poly(ADP-ribose) (PAR) qui agit comme un signal pour les autres protéines de la réparation de l'ADN telles que l'ADN ligase III, l'ADN polymérase bêta et XRCC1. Une fois la réparation effectuée, les chaînes de PAR sont dégradées par la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). Dans les dernières décennies, les approches bioinformatiques et génomiques ont identifié PARP1 comme un des membres de la famille des PARP qui contient 17 autres protéines toutes dotées d'un domaine catalytique conservé (Hakme et al., 2008). Dans cette famille de protéines, jusqu'à présent seulement PARP1, PARP2 et plus récemment PARP3 ont été définies comme facteurs de réponse aux dommages à l'ADN. En dépit des similitudes structurales élevées au sein de leurs domaines catalytiques, les trois protéines présentent des différences structurales importantes dans leurs domaines de liaison à l'ADN reflétant ainsi des différences sélectives dans les structures d'ADN qui active chaque enzyme. On considère que PARP1 se lie et répond à plusieurs types de structures d'ADN endommagé, parmi lesquelles, les cassures simple brin, les fourches de réplication bloquées et les cassures double brin (Krishnakumar and Kraus, 2010), PARP2 participe à la reconnaissance des lacunes (présentes sur le brin retardé des jonctions ARN-ADN qui seront par la suite éliminées par la RNase H) et PARP3 semble répondre de manière plus sélective à des cassures double brin (Boehler et al., 2011; Rulten et al., 2011).

La poly-ADP-ribosylation se produit généralement sur des protéines nucléaires alors que la mono-ADP-ribosylation est majoritairement retrouvée sur des protéines cytoplasmiques. La poly-ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle réversible. L'hydrolyse du pont protéine-ADP-ribose ou des ponts entre les unités d'ADP-ribose est réalisée par des ADP-ribose hydrolases. Cette modification permet la régulation de protéines impliquées dans divers processus cellulaires. Cette modification ajoute une charge négative à la protéine modifiée affectant ainsi sa structure. Le transfert d'un ADP-ribose provenant du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) sur des résidus spécifiques des protéines substrats constitue la mono-ADP-ribosylation. Cet ADP-ribose peut alors servir d'accepteur pour des ADP-ribosylations supplémentaires et génère des protéines poly-ADP-ribosylées. La mono-ADP-ribosylation est prédominante dans la cellule par rapport à la poly-ADP-ribosylation

PARP1, qui est activée en réponse aux dommages à l'ADN, est impliquée dans la régulation de plusieurs voies de réparation des cassures simple et double brin (De Vos et al., 2012). En

effet, PARP1 est responsable de la PARylation de nombreux acteurs adjacents à la lésion de l'ADN impliquant notamment une décondensation de la double hélice et rendant la lésion accessible aux différents protagonistes de la réparation (Luo and Kraus, 2012). Les souris et les cellules déficientes pour PARP1 sont sensibles aux rayonnements ionisants, aux agents alkylants et aux dommages oxydatifs (de Murcia et al., 1997; Trucco et al., 1998). L'activité de PARP1 a surtout été impliquée dans la réparation par excision de base (BER) où elle recrute différents acteurs de cette voie de réparation comme la DNA ligase III, la 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) et XRCC1 au site de dommage (Dantzer et al., 1999; Noren Hooten et al., 2011). Cependant, il a récemment été décrit que le BER pouvait opérer en l'absence de PARP rendant son rôle dispensable (Campalans et al., 2013; Strom et al., 2011). PARP1 a été décrit comme interagissant avec deux acteurs essentiels de la réparation par excision de nucléotide (NER), damaged DNA-binding protein 2 (DDB2) (Robu et al., 2013) et Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A (XPA) (King et al., 2012), soulignant son rôle dans d'autres voies de réparation des lésions simple brin. Finalement, PARP1 influence le recrutement, au niveau de la fourche de réplication bloquée, des acteurs de la RH comme le complexe MRN et BRCA2 (Yang et al., 2004) (Ying et al., 2012) ce qui fait de PARP1 un acteur important du redémarrage de la fourche de réplication. Ainsi PARP1 peut favoriser la RH ou le NHEJ suivant les protéines avec lesquelles il interagit (Couto et al., 2011) (Spagnolo et al., 2012).

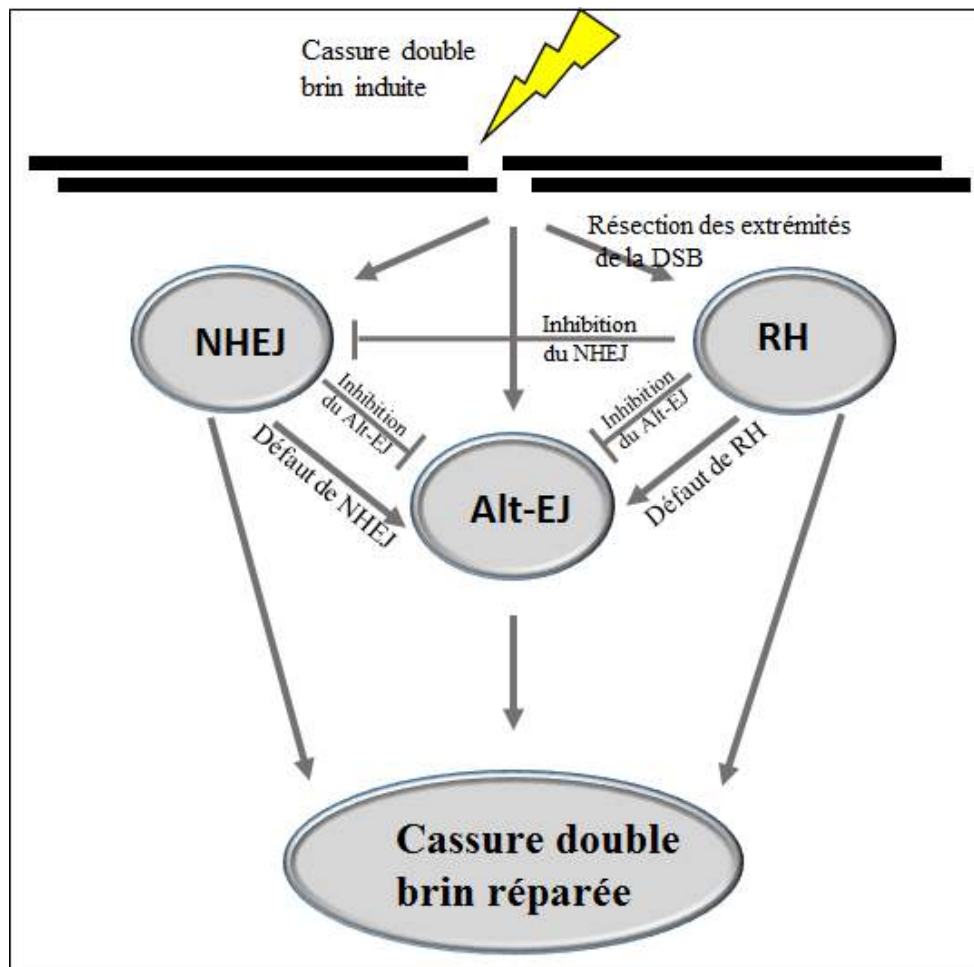
Ces dernières années des études ont montré que l'inhibition de PARP-1 en présence de DSB augmente l'instabilité génétique (Morrison et al., 1997) (Tong et al., 2002), suggérant de ce fait un rôle de PARP-1 dans la réparation des DSB par NHEJ-Alternatif (Audebert et al., 2004; Mansour et al., 2010; Soni et al., 2015) qui est une voie de réparation très mutagène. Par ailleurs, la cytotoxicité sélective induite par les inhibiteurs de PARP dans les cellules cancéreuses est probablement liée au rôle de PARP dans la réparation de l'ADN (Farmer et al., 2005). En effet, il a été décrit que l'action des inhibiteurs de PARP est de piéger la protéine PARP au niveau du site de lésion de l'ADN empêchant ainsi la progression et le redémarrage de la fourche de réplication (Helleday, 2011).



**Figure 4** : Modèle de la létalité synthétique générée par les inhibiteurs de PARP dans les cellules BRCA1 - / - (Aly and Ganesan, 2011). (A) Dans les cellules normales, les cassures simple brin et des lésions de base sont réparées efficacement par des processus de réparation impliquant la PARP avec la réparation par excision de base (BER). Les cassures non réparées qui persistent durant la phase S et qui conduisent à l'arrêt de la fourche de réplication au niveau des DSB sont efficacement prises en charge par la RH via BRCA1, puis la fourche de réplication redémarre. PARP peut également jouer un rôle dans le redémarrage de la fourche de réplication. (B) Dans le cas du traitement des cellules aux inhibiteurs de PARP (Parpi), la réparation des cassures simple brin par le BER est altérée, conduisant à leur accumulation. Il en résulte une augmentation de la quantité de lésions à la fourche de réplication. Celles-ci doivent être réparées par la RH via BRCA1. (C) Dans les cellules BRCA1 - / -, la réparation de la fourche de réplication et des DSB via la RH est très fortement altérée. Il peut y avoir un redémarrage de la fourche de réplication par un recours accru des mécanismes PARP-dépendants dans la phase S et une augmentation de l'activité de PARP. (D) Dans les cellules BRCA1 - / - et traitées avec les inhibiteurs de PARP (Parpi), une charge accrue de cassures simple brin non réparées entre en phase S. Les lésions qui en résultent ne peuvent pas être réparées par la RH qui est inactive, ce qui conduit à l'échec du redémarrage de la fourche de réplication, l'accumulation de DSB non réparées et la mort des cellules.



L'hypersensibilité aux inhibiteurs de PARP des cellules tumorales BRCA mutées déficientes en RH, serait liée à une hyperactivation de la voie de réparation par le NHEJ induisant une instabilité génétique (Patel et al., 2011). Une autre théorie pour expliquer cette sensibilité est la conséquence de l'implication de la PARP dans la réparation des cassures simple brin et des nicks par le BER (Prasad et al., 2015). Le traitement aux inhibiteurs de PARP, dans les cellules RH-déficientes, entraîne un défaut de réparation des dommages par le mécanisme du BER (Aly and Ganesan, 2011). Ces dommages non réparés dégénèreraient en DSB, ne pouvant pas être réparés car la RH est défectueuse à cause de BRCA muté. Dans ce cas, les inhibiteurs de PARP sont seulement toxiques pour les cellules qui sont RH déficientes comme les cellules BRCA mutées (Figure 4). Ce qui a conduit à la notion de létalité synthétique (Aly and Ganesan, 2011).



**Figure 5 :** Modèle de l'organisation hiérarchique des voies de réparation des DSB, dans lequel le NHEJ-Alternatif est fortement contrôlé (Iliakis et al., 2015). Suite à l'induction de la DSB, la réparation peut se faire directement en utilisant l'une des voies qui sont représentées ci-dessus (RH, NHEJ et Alt-EJ), en fonction de l'état de la chromatine et/ou de la phase du cycle cellulaire. La RH et le NHEJ inhibent chacun le Alt-EJ pour préserver l'intégrité du génome car le Alt-EJ est très mutagène. Lorsque la RH et le NHEJ sont défectueux, le Alt-EJ est utilisé comme voie de secours pour la réparation. Ces trois voies peuvent conduire à la réparation de la cassure double brin.

## **B-6- CHOIX ENTRE MECANISMES DE REPARATION DES DSB**

Les différentes voies de réparation des DSB se distinguent en grande partie dans leur capacité à restaurer efficacement un génome lésé. En vertu de leur structure et de leur composition, les complexes protéiques impliqués dans les différentes voies de réparation des DSB (RH, c-NHEJ alt-NHEJ et SSA) ne présentent pas la même efficacité de réparation (Ceccaldi et al., 2016). Ainsi, ces voies ne peuvent donc pas être considérées comme équivalentes (Figure 5). Le maintien de l'intégrité du génome est d'une importance capitale pour la survie de tout organisme et jusqu'à 10 DSB sont induites par jour dans chaque cellule du corps humain, il est important pour la cellule d'assurer la restitution de l'information génétique endommagée sans erreur (Vilenchik and Knudson, 2003). Cela implique que le choix entre les différentes voies ne peut être aléatoire, ou être décidé par la concurrence, au contraire, il est conçu avec l'objectif ultime de maximiser les chances de maintien de l'intégrité du génome. Dans ce cadre, les cellules utilisent préférentiellement la voie de réparation des DSB qui préserve de manière optimale leur génome, en fonction de leurs conditions environnementales et physiologiques. Cela suggère qu'en phase G1 du cycle, les cellules choisissent d'abord le c-NHEJ puis le NHEJ-Alternatif, lorsque le c-NHEJ est défectueux. La RH est pratiquement inactive dans la phase G1 chez les eucaryotes supérieurs. Les cellules déficientes en c-NHEJ, lorsqu'elles sont irradiées en phase G1, montrent une fréquence accrue des translocations par rapport aux cellules normales (Natarajan et al., 2008; Soni et al., 2014). Ces études montrent que le NHEJ-Alternatif augmente la formation de translocation chromosomique, alors même que cette voie est utilisée à défaut du c-NHEJ. De même, en phase G2 et S, les cellules utilisent d'abord la RH, puis le c-NHEJ et enfin le NHEJ-Alternatif seulement en dernier recours (Frit et al., 2014). La résection du brin 5' est une étape indispensable à la RH, et une fois cette résection entamée, un retour en arrière pour réparer une DSB par NHEJ est impossible. Dans certains cas, si la résection est entamée mais que la RH ne peut pas s'exécuter, le NHEJ-Alternatif peut prendre le relais puisque ce processus passe aussi par une première étape de résection. En effet, il a été montré que l'inhibition chimique de PARP1 et / ou la ligase 3, deux facteurs du NHEJ-Alternatif, dans les cellules déficientes en RH, entraîne une diminution significative de la formation de translocation, montrant que le NHEJ-Alternatif (source des translocations en absence de la RH), peut également remplacer la RH lorsque celle-ci est défectueuse (Soni et al., 2014). En plus du cycle cellulaire ou encore la résection, il existe d'autres facteurs qui influencent le choix des voies. C'est notamment le cas des protéines 53BP1 et BRCA1 qui sont spécifiquement impliquées dans ce choix.

Il faut tout d'abord noter que les deux protéines 53BP1 et BRCA1 sont extrêmement importantes puisque chez la souris le KO de BRCA1 est léthal (Deng and Scott, 2000) et celui de 53BP1 conduit à des défauts de croissance et une immunodéficience (Ward et al., 2003). Ces deux facteurs, 53BP1 et BRCA1 se livrent une forte concurrence dans le choix de la voie de réparation. 53BP1 favorise le NHEJ grâce à sa capacité à inhiber la résection (Bothmer et al., 2011) tandis que BRCA1 facilite la résection notamment *via* son interaction avec CtIP (Yun and Hiom, 2009). La compétition entre BRCA1 et 53BP1 est illustrée par le fait que la déplétion de 53BP1 favorise la RH (Tang et al., 2013), celle de BRCA1 favorise le NHEJ (Bunting et al., 2010) et la double déplétion restaure le phénotype sauvage (Bunting et al., 2010; Cao et al., 2009). Ainsi la déplétion de l'un déséquilibre la balance qui est rééquilibrée dans le cas d'une double déplétion. Par ailleurs, une étude a proposé un modèle dans lequel la localisation nucléaire dicte le choix de la voie de réparation de l'ADN (Lemaitre et al., 2014).

Il faut noter que ces mécanismes de réparation ont lieu dans un contexte chromatinien qui implique un changement dans sa structure pour rendre accessible les sites endommagés aux protéines de la réparation des DSB (Dabin et al., 2016).

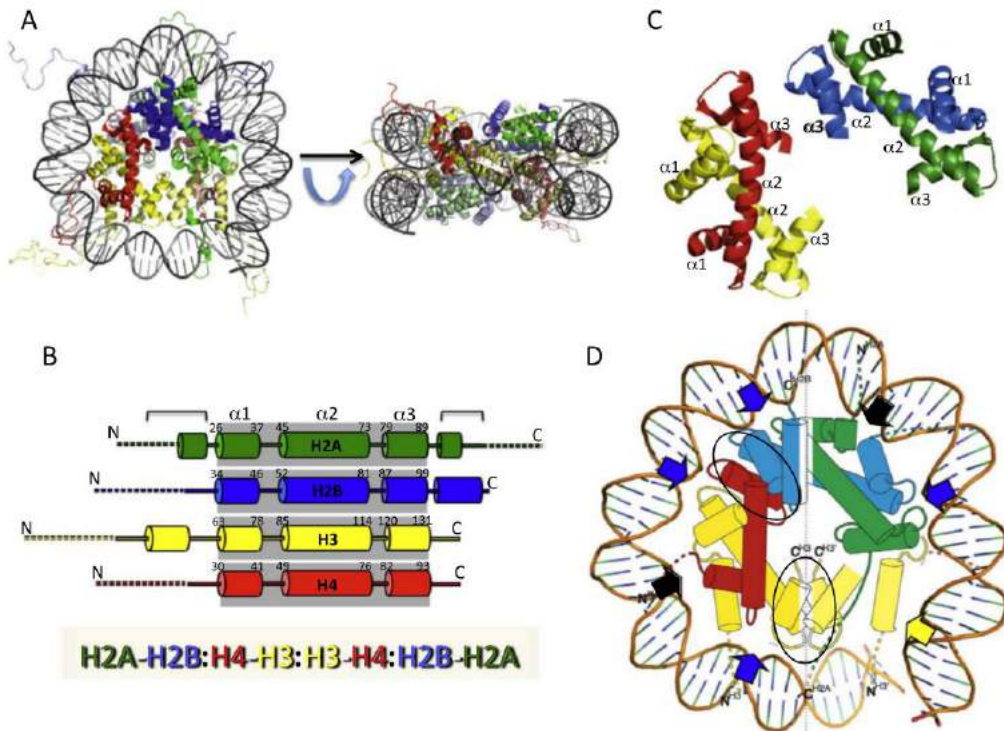
## **I-C- LA CHROMATINE**

### **C-1- DEFINITION**

Les eucaryotes, tels que la levure et l'homme, conditionnent leur molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) dans un compartiment cellulaire distinct, le noyau. Cette molécule d'ADN est le support de l'information génétique. L'ADN est intégré au sein d'un complexe nucléoprotéique connu sous le nom de « chromatine ». Walther Flemming en 1882 fut le premier scientifique à l'avoir appelé ainsi à cause de sa forte affinité pour des colorants. Ainsi, chez les eucaryotes, la chromatine contient l'ensemble du génome dans un noyau cellulaire d'environ 5 micromètres de diamètre. Le nucléosome, l'unité de base de la chromatine, est composé d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule la molécule d'ADN (147 paires de bases d'ADN). Chaque octamère se compose de 2 dimères H2A-H2B et d'un tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> et peut être stabilisé par l'histone lien H1. Dans les cellules en division, lors de la mitose, la chromatine peut se condenser pour former des structures individuelles et visibles, les chromosomes, c'est le niveau de compaction le plus élevé. Dans les cellules qui ne sont pas en mitose, la chromatine est distribuée dans le noyau et organisée en régions condensées « l'hétérochromatine » et en régions plus ouvertes l'« euchromatine ».

## **1-a- Le nucléosome**

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Il sert de premier niveau de compaction de l'information génétique. On distingue l'ADN nucléosomal (autour des histones) et l'ADN internucléosomal qui relie deux nucléosomes (40 à 70 paires de base) pour former un collier de perle de 11 nm de diamètre (Luger et al., 2012)



**Figure 6** : structure détaillée du nucléosome (Cutter and Hayes, 2015). (A) L'octamère d'histone est une structure analogue à un tambour dans lequel la super hélice d'ADN s'enroule, pour donner une structure en forme de disque d'environ 5,5 nm de hauteur et de 11 nm de diamètre. (B) Schéma montrant la structure secondaire des protéines d'histones de base, avec les hélices représentées par des colonnes. (C) Le fold domaine des dimères histones H2A-H2B (vert / bleu) et H3-H4 (rouge / jaune). (D) Schéma montrant une partie du nucléosome. Les flèches bleues et noires indiquent les sites d'interaction à l'ADN. La flèche jaune indique le site d'interaction de l'histone H3.

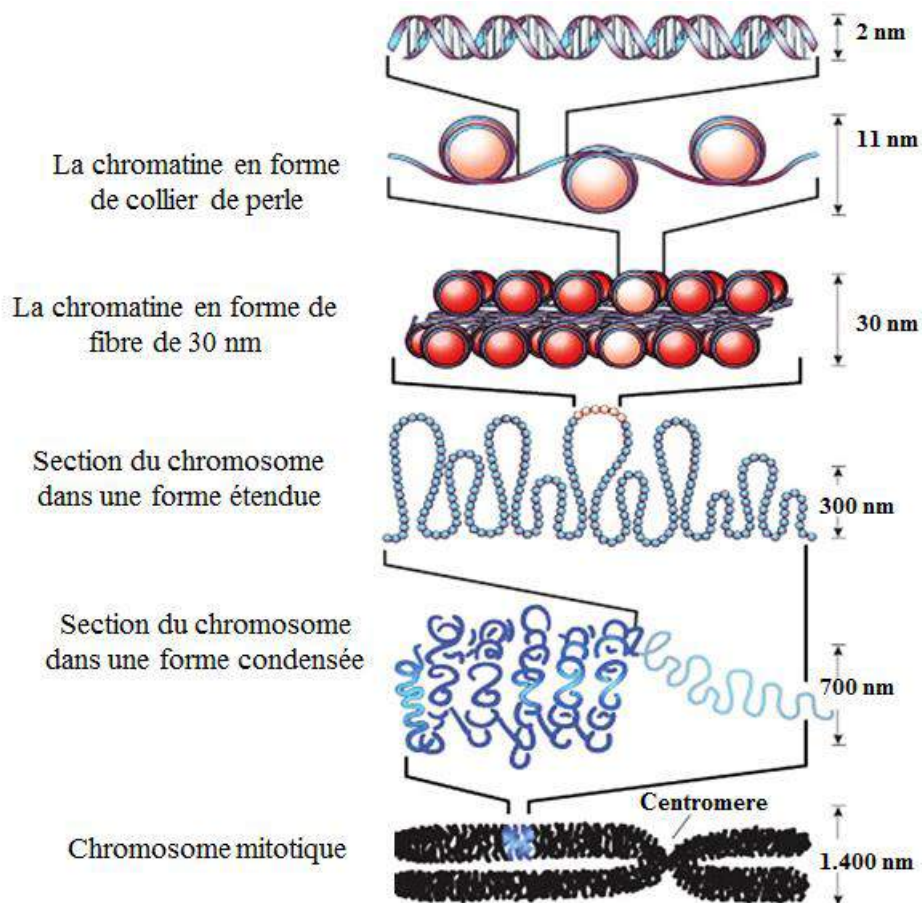
Dans les cellules eucaryotes, l'ADN génomique est organisé hiérarchiquement par des petites protéines de 11 à 14 kDa, les histones. Riches en résidus basiques, les histones sont le composant principal de la chromatine et font partie des protéines les plus conservées chez les eucaryotes (Cutter and Hayes, 2015). Elles sont chargées positivement, ce qui permet des interactions de type électrostatiques avec la super hélice d'ADN. L'assemblage du nucléosome, au cours de la phase S, se fait en plusieurs étapes successives. La formation d'un tétramère central (H3-H4)<sub>2</sub> sur lequel se fixent deux dimères (H2A-H2B) (Smith and Stillman, 1991). L'ADN vient ensuite entourer l'octamère en liant les domaines histone-fold, permettant une compaction de l'ADN (Figure 6). Les interactions entre histones et ADN sont des interactions faibles et par conséquent labiles. Elles ne sont pas spécifiques de la séquence d'ADN puisqu'il n'y a aucun contact avec la base. Enfin, les histones appelées « histones du cœur » sont caractérisées par un domaine globulaire constitué de trois hélices alpha reliées par deux courtes boucles, qui leur permet d'interagir entre elles (Luger et al., 1997) (Figure 6B), ainsi que par la présence d'une queue N-terminale non structurée d'une trentaine d'acides aminés qui émerge du nucléosome et peut subir différents types de modifications post-traductionnelles (Acétylation, Ubiquitination, Phosphorylation, Méthylation). Le nucléosome est stabilisé par la présence de l'histone de liaison H1 (histone « linker » de 21 kDa) positionnée au point d'entrée - sortie de l'ADN enroulé autour des histones du cœur (Campos and Reinberg, 2009).

### **1-b- Les niveaux supérieurs de compaction**

Lorsque la chromatine est examinée par microscopie électronique, le nucléosome apparaît sous forme d'un ensemble de billes reliées les unes aux autres par un filament (Oudet et al., 1975). En effet, le premier niveau de compaction, correspond à l'enchaînement des nucléosomes constituant la fibre de 11 nm, structure dite en « collier de perles » (Figure 7). La fibre de 11 nm s'enroule sur elle-même pour former la fibre de 30 nm de diamètre qui est le deuxième niveau de compaction. Chaque tour comprenant 6 à 8 nucléosomes (Tremethick, 2007). Ces fibres de 30 nm de diamètre ont principalement été observées *in vitro* (Maeshima et al., 2014). Depuis le travail effectué par le groupe de Dubochet en 1986 (McDowall et al., 1986), plusieurs études structurales ont fourni la preuve que la chromatine cellulaire est essentiellement constituée de façon irrégulière, pliée en fibres de 10 nm plutôt que de 30 nm de diamètre

(Maeshima et al., 2016). La structure tridimensionnelle précise et le mécanisme exact de formation de cette fibre sont encore débattus.





**Figure 7** : Organisation de la structure de l'ADN dans la chromatine (Felsenfeld and Groudine, 2003). Le premier niveau d'organisation est le nucléosome, dans lequel deux tours de la super hélice d'ADN (un total de 147 paires de bases) sont enroulés autour d'un octamère d'histones (fibre de 11 nm). Les nucléosomes sont ensuite reliés entre eux par de courts segments d'ADN de liaison. Au niveau suivant d'organisation, la chaîne de nucléosomes est pliée en une fibre d'environ 30 nm de diamètre. Ces fibres sont ensuite pliées dans des structures d'ordre supérieur aboutissant à la formation du chromosome mitotique.

Ces structures très condensées sont caractérisées par l'organisation de la fibre de 30 nm en boucles sur un squelette protéique (Woodcock and Ghosh, 2010).

La chromatine est une structure dynamique complexe composée d'ADN, de protéines histones, et d'autres composants protéiques non histones comme les facteurs de transcription. Les différents niveaux de compaction permettent de définir deux territoires structurellement et fonctionnellement distincts en interphase : l'euchromatine riche en gènes, moins condensée et l'hétérochromatine très condensée et pauvre en gènes (Tamaru, 2010), que l'on peut distinguer dans le noyau en microscopie électronique.

En effet, l'euchromatine constitue une forme relativement décondensée de la chromatine et contient des régions riches en gènes. Elle existe sous deux formes différentes en fonction du niveau de condensation. Elle se caractérise par la présence de modifications d'histones dont les majoritaires sont : la méthylation de la lysine 4 (H3K4me) et de la lysine 36 (H3K36me) (Santos-Rosa et al., 2002) de l'histone H3 et l'hyperacétylation des histones H3 et H4 (H3ac et H4ac) (Grunstein, 1997). Elle est ordonnée comme un complexe dynamique et va interagir avec différentes machineries cellulaires (l'ARN polymérase II, les complexes de modification ou de dynamique de la chromatine, etc.) pour permettre la transcription d'ARNm fonctionnels.

En revanche, l'hétérochromatine est une structure beaucoup plus compacte pauvre en gènes mais riche en régions répétées telles que les séquences satellites et les éléments transposables (Birchler et al., 2000). Elle est généralement décrite comme transcriptionnellement inactive. Elle nécessite tout de même une transcription à faible niveau pour être formée (Grewal and Elgin, 2007) et va participer à la réplication et la ségrégation des chromosomes. Les histones des régions d'hétérochromatine sont généralement dépourvues d'acétylation, et souvent méthylées sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) qui recrute la protéine d'hétérochromatine 1 (HP1) (Lachner et al., 2001).

## **C-2- LES VARIANTS D'HISTONES**

La famille des histones regroupe différents types de protéines. Les histones canoniques H2A, H2B.1/H2B.2, H3.1/H3.2 et H4, sont les constituants universels du nucléosome (Arents et al., 1991; Davey et al., 2002). Ces histones canoniques sont synthétisées majoritairement en phase S du cycle cellulaire et incorporées dans la chromatine essentiellement lors de la réplication. Par ailleurs, certaines de ces histones présentent des variants, c'est le cas des histones H2A, H2B, H3 et H1 (Maze et al., 2014). La synthèse des variants d'histones se fait

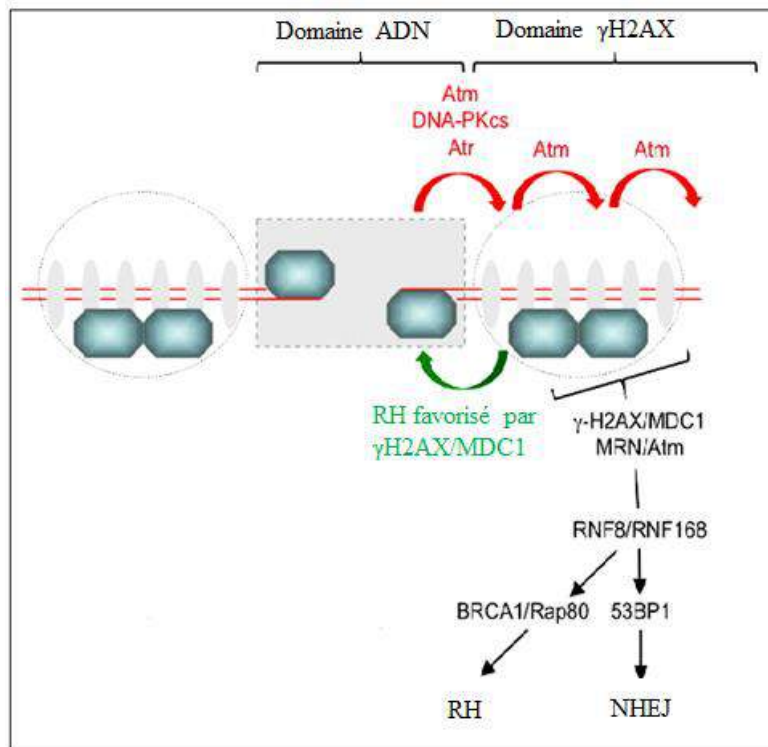
pendant et en dehors de la phase S et parfois dans des tissus spécifiques. Certains ont des fonctions spécialisées lors des processus tels que la réparation de l'ADN (H2AX, H2A.Z ou macroH2A), la spermatogenèse (TSH2B) et l'assemblage du kinétochore (CENP-A) (De Rop et al., 2012; Montellier et al., 2013; Yuan et al., 2010). Ces variants précités sont les principaux chez l'homme. Des chaperones (HIRA, DAXX, DEK, ASF1, CAF1) sont impliquées dans le dépôt des protéines histones dans les nucléosomes (Dahlin et al., 2015; Gurard-Levin et al., 2014). Elles régulent la dynamique des histones dans la chromatine. In vitro, les chaperones d'histones ont la capacité de faciliter le transfert progressif des histones purifiées sur l'ADN nu pour reconstituer un nucléosome à partir des composants purifiés. Les chaperones interviennent au niveau du nucléosome en coopération avec les remodeleurs de la chromatine (Hargreaves and Crabtree, 2011). Au niveau biochimique, certains variants, tels que macro-H2A et H2A.Z, présentent des séquences polypeptidiques hautement divergentes par rapport à l'histone canonique, au niveau du domaine globulaire, de la queue N-terminale ou seulement de quelques acides aminés, permettant ainsi, des changements majeurs dans la structure et la fonction de la chromatine lors du remplacement des histones canoniques par leurs variants (Ausio, 2006). D'autres variants, tels que H3.3, présentent des différences plus subtiles qui peuvent néanmoins provoquer des changements cruciaux dans la chromatine (Elsasser et al., 2012; Hake et al., 2005; Wen et al., 2014). Les variants d'histones sont incorporés au sein d'un locus précis pour permettre soit la mise en place de domaines chromatiniens spécifiques, soit la régulation de processus tels que la réparation ou la transcription (Campos and Reinberg, 2009).

## **2-a- LES VARIANTS D'HISTONES H2A**

L'histone H2A présente 4 variants : H2AX, H2A.Z, MacroH2A et H2ABbd (Bonisch and Hake, 2012). H2AX est différent par sa partie C-ter qui comporte la sérine 139, phosphorylée après dommage à l'ADN. H2A.Z a une partie C-ter plus courte contrairement à MacroH2A qui possède une queue C-ter plus longue. H2ABbd est le variant le plus court avec un C-ter tronqué. Les variants H2A.X et H2A.Z vont être décrits plus en détails ci-dessous.

## **a-1- Le variant H2A.X**

De nombreuses études ont montré l'importance du variant H2A.X dans la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) (Scully and Xie, 2013). H2AX est distribué dans l'ensemble de la chromatine chez les mammifères et constitue ~10% des molécules totales de H2A dans les fibroblastes humains normaux, ce pourcentage varie en fonction du type cellulaire. Lors de l'apparition de dommages à l'ADN, le variant H2AX est phosphorylé sur la sérine 139 par des protéines kinases (ATR, ATM, DNA-PK), formant des foyers  $\gamma$ H2AX qui peuvent se propager jusqu'à plusieurs mégabases chez les mammifères (Iacovoni et al., 2010) (Rogakou et al., 1998). Cette phosphorylation de H2AX facilite le recrutement de la machinerie de réparation, ainsi que celui de remodelleurs de la chromatine tels que INO80 et SWR1 (van Attikum et al., 2007; van Attikum et al., 2004). Plus récemment, la tyrosine 142 de H2AX a été identifiée pour être phosphorylée par WSTF. L'événement de phosphorylation sur la sérine 139 de H2AX est accompagné de la déphosphorylation de la Tyrosine 142 de H2AX, résidu constitutivement phosphorylé en absence de dommage (Xiao et al., 2009). La façon dont les protéines effectrices arrivent à lire et interpréter ces deux états de phosphorylation de H2AX reste en suspens. Le variant H2A.X est également impliqué dans l'apoptose (Rogakou et al., 2000), la recombinaison VDJ (Chen et al., 2000), la méiose (Mahadevaiah et al., 2001) et la réplication (Ward and Chen, 2001).



**Figure 8** : réparation des cassures double brin (DSB) grâce au domaine  $\gamma$ H2AX de la chromatine (Scully and Xie, 2013). L'activité de la kinase ATM favorise la propagation du signal  $\gamma$ H2AX sur des centaines de kilo bases autour de la cassure. Un défaut d'ATM en réponse à la DSB conduit vers une réponse  $\gamma$ H2AX plus localisée et favorisée par d'autres kinases telle que la DNA-PKcs et ATR. La fonction du complexe Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN), des facteurs BRCA1 et 53BP1 au niveau de la DSB est indépendant de H2AX. Cependant, leur recrutement aux alentours de la DSB est contrôlé par le complexe  $\gamma$ H2AX/MDC1. Finalement, le complexe  $\gamma$ H2AX/MDC1 joue un rôle important lors de la réparation des DSB par RH via la régulation de la résection des extrémités de l'ADN, puis dans le NHEJ en favorisant le recrutement de 53BP1. Le rectangle gris montre le site de la DSB et les deux cercles situés de part et d'autre de la DSB montrent les sites d'accumulation des protéines qui participent à la réparation. Le complexe  $\gamma$ H2AX/MDC1 favorise le recrutement des protéines ubiquitine ligases E3, RNF8 et RNF168 qui d'une part entraîne le recrutement du complexe BRCA1-RAP80 pour favoriser la réparation des DSB par RH, et d'autre part, le recrutement de 53BP1 pour favoriser la réparation par NHEJ.

## 1-i- H2AX dans la réparation des DSB

Les DSB provoquent une réaction très étendue dans la chromatine, caractérisée par la phosphorylation de l'histone H2AX sur la sérine 139 en position C-terminale (pour former des domaines « $\gamma$ H2AX») (Rogakou et al., 1998). La sérine S139 est la cible privilégiée des kinases (ATM, ATR et DNA-PKcs) qui participent à la signalisation des dommages à l'ADN (Burma et al., 2001). La réponse  $\gamma$ H2AX contribue à la réparation des DSBs rencontrées dans plusieurs contextes (Figure 8). L'étendue de la propagation du domaine  $\gamma$ H2AX n'est pas simplement définie par la «distance» en paires de bases du site de coupure, car il dépend également de l'architecture de la chromatine préexistant au locus lésé mais aussi de la présence de gènes activement transcrits (Caron et al., 2012; Iacovoni et al., 2010). À l'heure actuelle, on ne sait pas ce qui définit la limite extérieure d'un domaine  $\gamma$ H2AX. Une étude chez la levure suggère que l'hétérochromatine pourrait supprimer  $\gamma$ H2AX localement, mais ce blocage n'est pas absolu pour la propagation du signal  $\gamma$ H2AX (Kim et al., 2007).  $\gamma$ H2AX aurait un rôle de plateforme pour le recrutement d'acteurs de la réparation des DSBs, en particulier MDC1 qui se lie directement à  $\gamma$ H2AX via la séquence BRCT de MDC1 (Stewart et al., 2003; Stucki et al., 2005). MDC1 est une protéine d'échafaudage à multi-domaine qui régule la plupart, sinon toutes les fonctions de  $\gamma$ H2AX. MDC1 recrute le complexe hétérotrimérique Mre11 / Nbs1 / Rad50 (MRN) par interaction directe des sites phosphorylés de MDC1 avec le domaine FHA (Forkhead associated domain) de NBS1 (Chapman and Jackson, 2008). Le complexe MRN joue un rôle important dans les premières réponses à la DSB, contribuant à la résection des extrémités de l'ADN grâce à l'activité endonucléase de MRE11, et au recrutement de la kinase ATM (Stracker and Petrini, 2011; Xie et al., 2009). L'ubiquitination des histones par les ubiquitine ligases RNF8 et RNF168 est nécessaire pour le recrutement efficace de 53BP1 et BRCA1 (facteurs majeurs de la réparation des DSB) au domaine  $\gamma$ H2AX / MDC1 de la chromatine (Smeenk and Mailand, 2016). En effet, RNF8 lie directement MDC1, recrute RNF168 et mono ubiquitine les composants de la chromatine, parmi lesquels l'histone H2A au niveau des résidus K13/K15. Néanmoins, il a été montré que 53BP1 via son domaine Tudor, reconnaît H2A ubiquitiné sur le résidu K15 (H2AK15Ub) et l'ubiquitination semble faciliter la liaison des domaines Tudor de 53BP1 aux marques constitutives de la chromatine parmi lesquelles H4K20me2 (Botuyan et al., 2006; Fradet-Turcotte et al., 2013). Le complexe BRCA1-RAP80 est recruté au domaine de la chromatine  $\gamma$ H2AX / MDC1 via l'interaction physique de la protéine de liaison RAP80 (Wang et al., 2007).

Par ailleurs, Les souris KO pour H2AX sont viables même si les mâles sont stériles. Elles présentent une dérégulation modeste de la recombinaison VDJ lors du développement des cellules B. Ces souris KO pour H2AX montrent une instabilité chromosomique et un défaut de réparation des DSB (Celeste et al., 2002).

### **a-2- Le variant d'histone H2A.Z**

Chez l'homme, le variant H2A.Z existe sous deux formes, H2A.Z-1 et H2A.Z-2 (Dryhurst et al., 2009; Matsuda et al., 2010). Ces deux protéines sont codées par des gènes différents dont les séquences varient seulement de quelques nucléotides, générant deux protéines différentes de trois acides aminés (Dryhurst et al., 2009). Une description plus détaillée de ce variant sera faite ici car il a fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse. Le variant H2A.Z est conservé de la levure à l'homme avec 90% de conservation au niveau de la séquence entre les différentes espèces. Cependant, il présente seulement 60% d'homologie avec l'histone canonique H2A (Iouzalén et al., 1996).

L'incorporation de H2A.Z dans le nucléosome pourrait influencer sa stabilité. Certains auteurs affirment que les nucléosomes portant H2A.Z sont plus stables, tandis que d'autres ont observé que l'incorporation de H2A.Z déstabilise le nucléosome (Abbott et al., 2001; Park et al., 2004; Suto et al., 2000). La dynamique (incorporation -éviction) de H2A.Z dans le nucléosome est réalisée par différents complexes. Le complexe de remodelage de la chromatine SCRAP est impliqué dans le dépôt de H2A.Z, alors que le complexe p400 / TIP60 est connu pour contrôler le dépôt et la localisation de H2A.Z (Lee et al., 2012; Ruhl et al., 2006). Chez l'homme, YL1 a été identifié comme chaperone spécifique du variant H2A.Z qui participerait à l'incorporation de celui-ci dans le nucléosome via les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants, SRCAP et P400-TIP60 (Latrick et al., 2016; Liang et al., 2016). Récemment, il a été décrit que (ANP32E), un membre du complexe TIP60, est responsable de l'éviction de H2A.Z du nucléosome (Obri et al., 2014).

H2A.Z est présent dans environ 10% des nucléosomes des mammifères et influencerait différents processus biologiques tels que le cycle cellulaire (Yang et al., 2016) et la réparation de l'ADN (Alatwi and Downs, 2015; Xu et al., 2012).

## 2-i- H2A.Z dans la transcription

L'expression des gènes chez les eucaryotes est fortement conditionnée par l'environnement local de la chromatine. De nombreux travaux effectués dans divers organismes (levure, homme) rapportent un effet de H2A.Z sur le contrôle de la transcription de nombreux gènes. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, environ 5% des gènes sont régulés par Htz1, l'homologue de H2A.Z (Meneghini et al., 2003). En outre, Htz1 est incorporé dans la chromatine au niveau des promoteurs de gènes inductibles, puis est enlevé lors de l'activation de la transcription (Santisteban et al., 2000). En effet, le rôle de H2A.Z dans la régulation transcriptionnelle est lié au fait qu'il est fortement enrichi dans les régions promotrices de plusieurs gènes. Bien que la raison précise de l'enrichissement de H2A.Z diffère légèrement entre les organismes eucaryotes, les études menées chez la levure et l'homme indiquent qu'au niveau du TSS, H2A.Z est régulièrement incorporé dans le nucléosome (Guillemette et al., 2005; Subramanian et al., 2013; Sutcliffe et al., 2009). La présence de H2A.Z est généralement corrélée à l'expression des gènes (Barski et al., 2007). Cependant, ce variant peut jouer un rôle positif ou négatif sur l'expression des gènes. Il a été montré que la présence de H2A.Z réprime l'expression de p21 et active la voie p53 (Gevry et al., 2007). De même, la présence de H2A.Z augmente en réponse à l'activation transcriptionnelle induite par l'œstradiol (Gevry et al., 2009).

## 2-ii- H2A.Z dans la réparation des DSBs

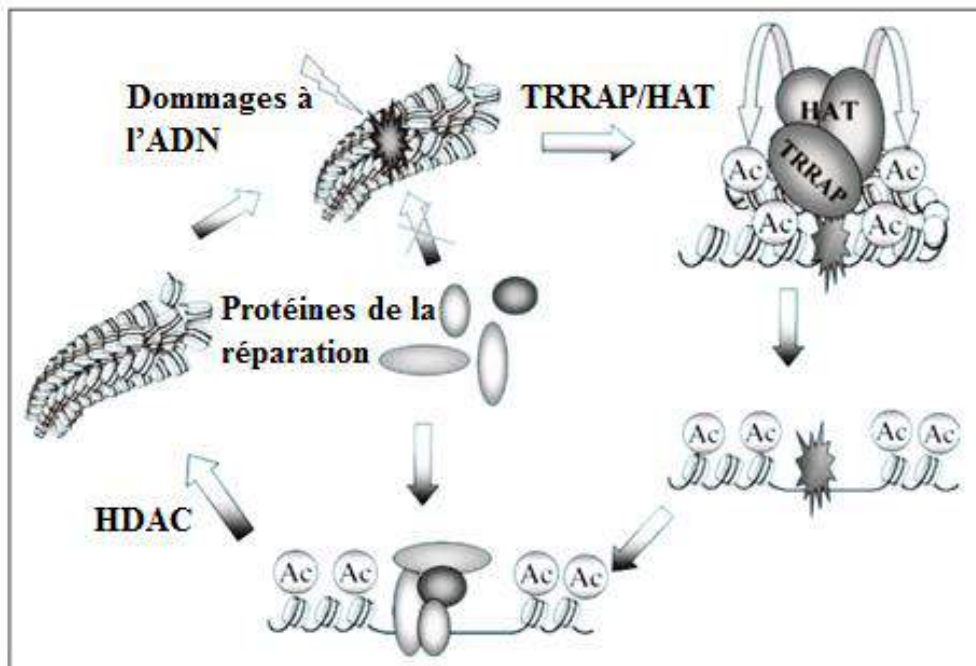
Les deux variants H2A.Z-1 et H2A.Z-2 présentent des différences de mobilité en réponse aux dommages (Nishibuchi et al., 2014). Le rôle de H2A.Z dans la réparation des DSB a été étudié chez la levure et l'homme où les enzymes de remodelage de la chromatine de la famille INO80, comme SWR1 chez la levure, p400 et SCRAP chez l'homme, sont capables d'échanger l'histone canonique H2A par son variant H2A.Z dans le nucléosome. Chez la levure, SWR1, membre du complexe SWR, supprime le dimère H2A/H2B et le remplace par un autre dimère H2A.Z/H2B (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2003; Mizuguchi et al., 2004). Par ailleurs, encore chez la levure, le complexe INO80 est connu pour catalyser la réaction inverse (Papamichos-Chronakis et al., 2011), c'est-à-dire, remplacer le dimère H2A.Z/H2B par le dimère d'origine H2A/H2B. De plus, l'inactivation du gène *H2AFZ* codant pour H2A.Z conduit à une instabilité génomique, à un défaut de la réparation des DSB, notamment dans la résection de l'ADN et à une sensibilité accrue aux agents endommageant l'ADN (Kalocsay et al., 2009). Il n'est pas encore clair si les effets observés sont causés par un rôle direct de H2A.Z ou sont le



résultat d'une dérégulation globale de l'expression génique (Papamichos-Chronakis et al., 2011).

Chez les mammifères, il a été montré que la présence de H2A.Z dans le nucléosome aux alentours des DSBs limite la résection des extrémités induite par CtIP (Xu et al., 2012). En l'absence de H2A.Z, le recrutement du complexe Ku70/Ku80 à la DSB (un facteur important dans la réparation des DSB par NHEJ) est altéré (Xu et al., 2012). En utilisant une approche expérimentale par ChIP, les auteurs ont constaté que H2A.Z est recruté à l'unique DSB induite par une endonucléase, d'une manière dépendante de p400 (Xu et al., 2012). De plus, la déplétion de H2A.Z par shRNA conduit à l'instabilité génomique et à une sensibilité accrue aux radiations ionisantes. Ils montrent également que l'efficacité des deux principaux mécanismes de réparation des DSB, la RH et le NHEJ est diminuée. Une autre étude par Alatwi et Downs suggère qu'INO80 favorise la RH en supprimant H2A.Z du nucléosome pour permettre la résection (Alatwi and Downs, 2015).

La réparation efficace des DSB nécessite la relaxation de la chromatine. Le complexe NuA4 participe à cette ouverture de la chromatine via d'une part l'incorporation du variant d'histone H2A.Z dans le nucléosome et d'autre part en participant à l'acétylation de l'histone H4. Des études ont démontré que l'accumulation de H2A.Z au niveau de la DSB est transitoire, et que son éviction du nucléosome est très rapide et nécessaire pour l'efficacité de la réparation de la DSB (Gursoy-Yuzugullu et al., 2015). Anp32e, une chaperone de H2A.Z qui interagit avec le domaine C-terminal de H2A.Z, est rapidement recrutée à la DSB. La fonction de la chaperone Anp32e est d'enlever H2A.Z du nucléosome, de sorte que le niveau de base de présence de H2A.Z dans le nucléosome revienne moins de 10 minutes après l'apparition des dommages à l'ADN. Un défaut d'Anp32e conduit à l'accumulation de H2A.Z dans le nucléosome au niveau de la DSB, ce qui se traduit par une conformation du nucléosome beaucoup plus réfractaire à l'acétylation des histones, aboutissant à une chromatine ayant une conformation fermée (Gursoy-Yuzugullu et al., 2015).



**Figure 9** : modèle du rôle de TRRAP dans l'acétylation des histones et reconfiguration de la chromatine au cours de la réparation de l'ADN (Murr et al., 2006). L'induction de la DSB conduit au recrutement du complexe HAT/TRRAP qui favorise l'acétylation des histones et donc l'ouverture de la chromatine pour faciliter l'accès de la machinerie de réparation au site lésé. A la fin de la réparation de la DSB, les histones sont déacétylées par les histones déacétylases (HDAC) pour rétablir la structure initiale de la chromatine.

## **C-3- LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES**

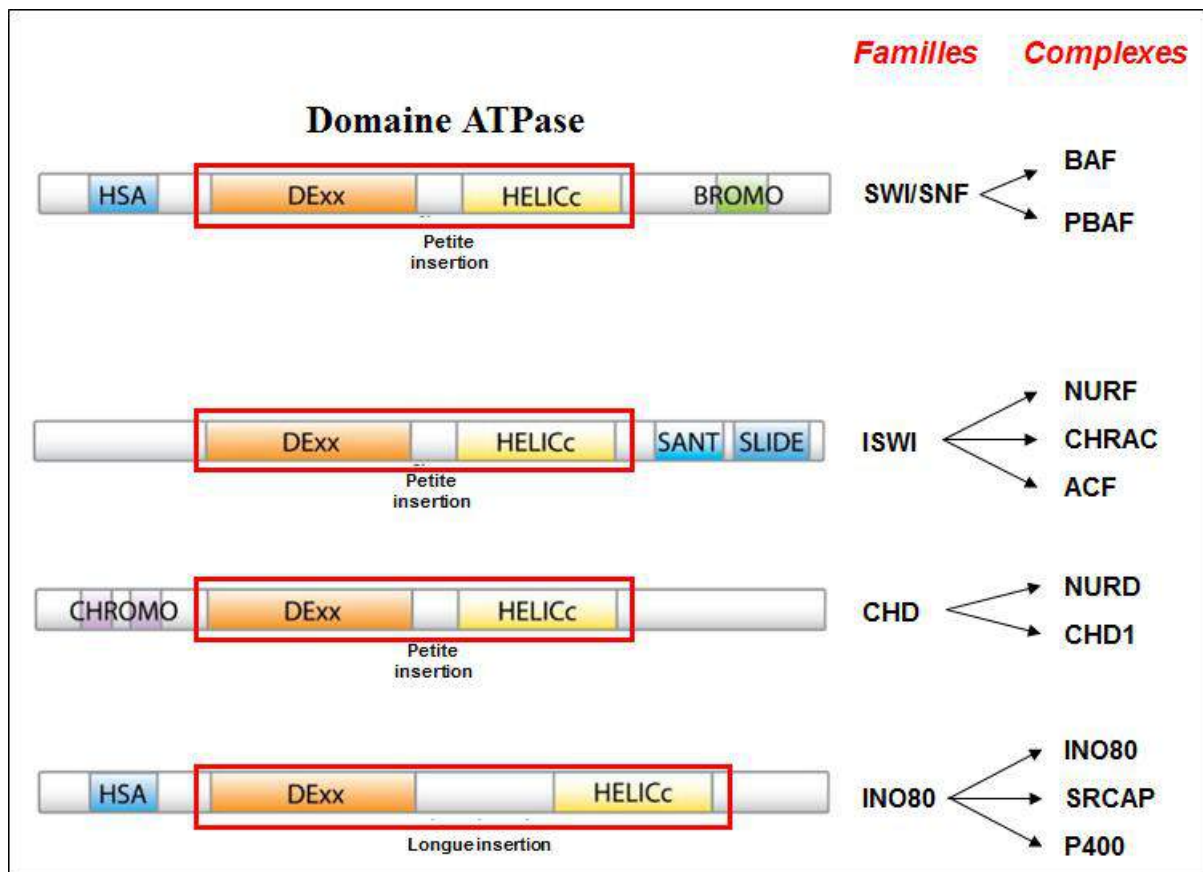
### **3-a- L'ACÉTYLATION DES HISTONES DANS LA REPARATION DES DSB**

L'acétylation des histones est une des modifications post-traductionnelles qui contrôle la compaction de la chromatine. Plusieurs études ont montré l'implication des complexes protéiques à domaine histone acétyltransférase (HAT) et l'acétylation de la chromatine dans la réparation des DSB. En effet, l'acétylation des histones au niveau des queues N-terminales sur les résidus lysine (chargés positivement) affaiblit leur interaction avec l'ADN qui est chargé négativement. Des études menées chez la levure ont montré que la délétion de l'extrémité N-terminale de l'histone H3 altère la réparation des DSBs. Dans les cellules de mammifères TRRAP et Tip60, une HAT, sont recrutées et se lient à la chromatine au niveau de la DSB (Murr et al., 2006). Le complexe TIP60/TRRAP est nécessaire pour l'efficacité de la réparation des DSBs par RH (Murr et al., 2006) (Figure 9). L'expression d'un mutant de TIP60 dépourvu d'activité HAT conduit au maintien de la chromatine dans un état condensé autour de la DSB, à un défaut de réparation et à l'apoptose (Ikura et al., 2000). Ces données laissent penser que la liaison efficace de tous les facteurs de réparation des DSBs en aval du complexe TIP60/TRRAP est dépendante de l'acétylation. L'activité histone acétyltransférase du complexe TIP60 est nécessaire pour activer la kinase ATM (Bhoumik et al., 2008). Pour cela TIP60 se lie à l'histone H3 triméthylée sur la lysine 9 et cette interaction active son activité acétyltransférase (Sun et al., 2009).

D'autres HAT sont recrutées au niveau des DSB. C'est le cas de GCN5, une enzyme qui catalyse l'acétylation des lysines de la queue N-terminale de l'histone H3 (Tamburini and Tyler, 2005). Les histones acétyltransférases p300 et CBP se localisent à la DSB où elles induisent l'acétylation des histones H3 et H4 et favorisent le recrutement des protéines comme le complexe Ku et stimulent la réparation des DSB par NHEJ (Ogiwara et al., 2011). La RH et le NHEJ sont également stimulés par une autre histone acétyltransférase, MOF. Des études ont montré que l'inhibition de MOF entraîne une formation tardive des foyers gamma-H2AX, ce qui entrave le recrutement de BRCA1 et 53BP1 à la DSB (Sharma et al., 2010). L'acétylation de la chromatine est un processus réversible. L'état d'acétylation des histones H3 et H4 varie au cours de la réparation, grâce à des histones déacétylases (HDAC) qui sont spécifiquement recrutées à la DSB (Tamburini and Tyler, 2005). Dans les cellules de mammifères, HDAC1 et

HDAC2 sont recrutées de façon précoce à la DSB où elles catalysent la déacétylation de H3K56 et H4K16, leur déplétion altère la réparation des DSBs par NHEJ (Miller et al., 2010).

Il existe d'autres modifications post-traductionnelles des histones qui peuvent influencer la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. On peut citer la méthylation qui peut être mono, di ou tri, l'ubiquitination, la phosphorylation, la sumoylation, la polyADP ribosylation (Smeenk and van Attikum, 2013)



**Figure 10** : Modèle représentatif des 4 grandes familles d'enzyme de remodelage ATP-dépendant (Tang et al., 2010). Le domaine ATPase est encadré en rouge, le bromodomaine en vert, est le domaine de reconnaissance des lysines acétylées, le chromodomaine en violet, est le domaine de reconnaissance des lysines méthylées. HSA en bleu est le domaine de liaison à l'actine, SANT et SLIDE en bleu ciel sont des domaines importants pour la liaison aux histones. Les domaines DExx en orange et HELICc en orange claire concentrent l'activité catalytique. La famille des remodeleurs de la chromatine SWI/SNF est composée de deux complexes protéiques : BAF et PBAF. La famille ISWI se compose de trois complexes : NURF, CHRAC et ACF. La famille CHD est composée de deux complexes NURD et CHD. La famille INO80 est composée de trois complexes : INO80, SRCAP et P400.

## C-4- LE REMODELAGE DE LA CHROMATINE

Le remodelage de la chromatine est un mécanisme qui utilise l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour changer la composition du nucléosome par l'éviction ou l'introduction des protéines histones ou leur glissement le long de la fibre d'ADN (Hargreaves and Crabtree, 2011).

La dynamique ATP-dépendante de la chromatine a été découverte chez la levure. Elle est l'un des mécanismes qui permet la compaction et la décompaction de la structure de la chromatine tout en conservant l'expression des gènes, la capacité de réplication, de recombinaison et de réparation de l'ADN (Kadoch and Crabtree, 2015). Les remodeleurs de la chromatine ATP-dépendants peuvent être divisés en quatre principales familles (Figure 10).

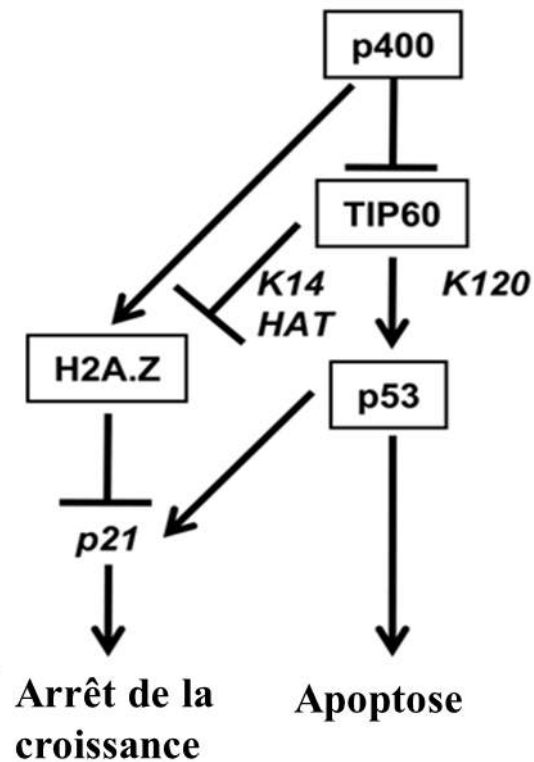
Les complexes de la famille SWI/SNF (SWItch/SucroseNonFermentable) ont été purifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* et se composent de 8 à 14 sous-unités, ceux de la famille ISWI (imitation-switch family) ont été purifiés chez *Drosophila melanogaster* et contiennent de deux à quatre sous-unités, ceux de la famille CHD (Chromodomain helicase DNA-binding protein) ont été purifiés chez le xénope et contiennent une à dix sous-unités et ceux de la famille INO80 ont été purifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* et contiennent plus de dix sous-unités.

Ces enzymes réalisent la relocalisation, le retrait et l'échange des protéines histones en utilisant l'ATP comme source d'énergie. Les complexes de remodelage de la chromatine jouent un rôle central dans la régulation de divers processus biologiques comme l'apoptose, la ségrégation des chromosomes, la réplication et la réparation de l'ADN.

### 4-a- LA FAMILLE INO80

Le complexe INO80 qui a initialement été purifié chez *Saccharomyces cerevisiae* contient environ quinze sous-unités (Shen et al., 2000). Chez la levure, les composants du complexe INO80 sont Ino80, Rvb1, Rvb2, Arp4 (Actin-related protein 4), Arp5, Arp8, l'actine, Nhp10 (Non-histone protein 10), ANC1 / Taf14, Ies1 (Ino Eighty Subunit 1), Ies2, Ies3, Ies4, Ies5 et Ies6. Rvb1 et Rvb2 sont des protéines essentielles et hautement conservées de la levure à l'homme (Tip49a et Tip49b chez les mammifères) (Jonsson et al., 2004). La grande famille INO80 se caractérise par la présence d'un domaine ATPase et des sous-unités en commun dont les protéines proche de l'actine ARP (Actin-related protein) et les hélicases Rvb1/2 (Bao and Shen, 2007). Cette famille est constituée des complexes suivants : INO80 et Domino de drosophile (Ruhf et al., 2001); INO80, SRCAP et p400/Tip60 de mammifères (Ikura et al., 2000; Ruhl et al., 2006), INO80 et SWR1 de levure (Chen et al., 2011). Le complexe INO80 grâce à son domaine ATPase, est capable de moduler la structure du nucléosome via le

phénomène de glissement qui précède l'éviction des histones du nucléosome *in vitro* (Cai et al., 2006). Chez la levure, INO80 assure également l'éviction des nucléosomes aux environs du site de cassure et cette activité est régulée par le complexe MRN connu pour être impliqué dans la réparation de l'ADN (Tsukuda et al., 2005). Il a été montré que INO80 est impliqué dans l'éviction du variant d'histone H2A.Z dans le corps des gènes, cette activité serait présente à l'origine pour corriger une mauvaise localisation de H2A.Z (Papamichos-Chronakis et al., 2011). Une analyse réalisée dans les cellules de mammifères (une souche embryonnaire mâle (ES) de souris, des fibroblastes 3T3 de souris et une lignée cellulaire humaine PC3), démontre que INO80 est nécessaire à la RH par l'intermédiaire de sa fonction dans la résection 5'-3' des extrémités de la DSB (Gospodinov et al., 2011).

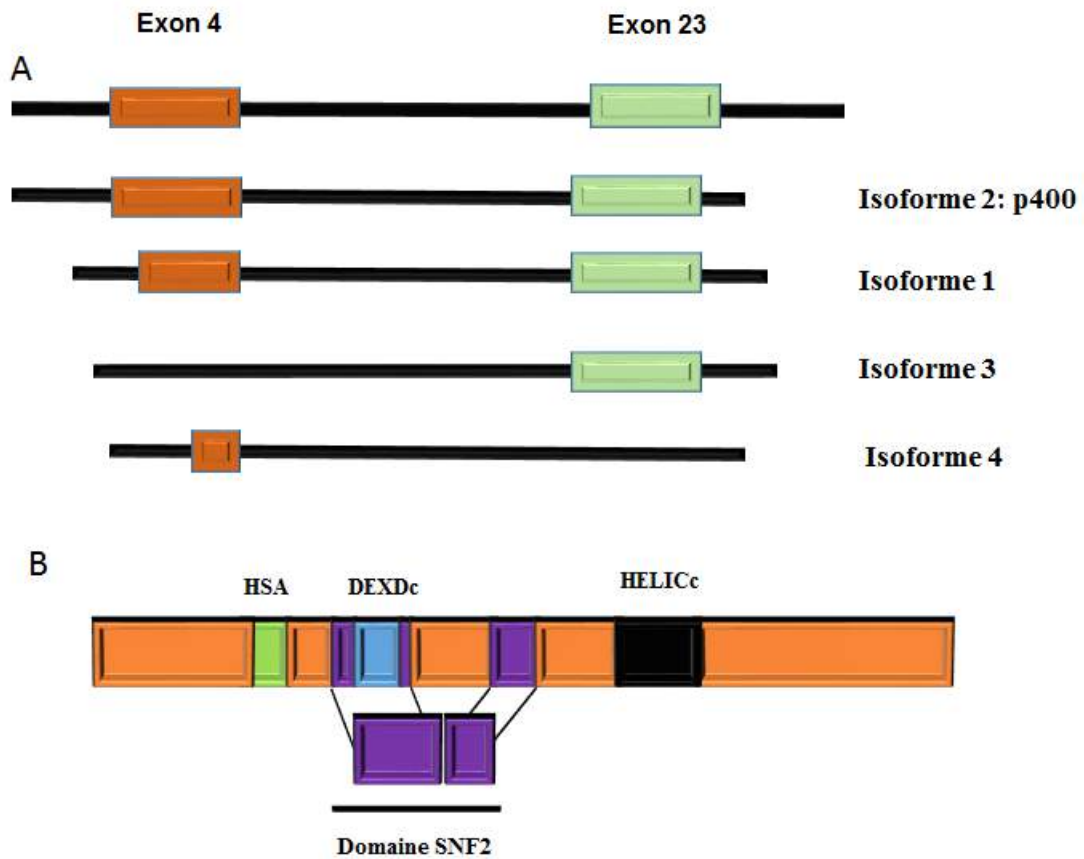


**Figure 11** : Modèle présentant l'interaction réciproque et antagoniste des protéines de P400 et TIP60 dans la régulation de p53 et les gènes cibles de p21 (Park et al., 2010). Ce modèle met l'accent sur l'acétylation de p53 induite par l'histone acétyltransférase TIP60 au niveau de la lysine 120, ce qui facilite l'apoptose et l'arrêt de croissance médiée par p53. L'ATPase p400 met en place le variant H2A.Z au niveau du promoteur du gène p21, ce qui contribue à la répression de ce gène et l'induction de la croissance. TIP60 acétyle le variant H2A.Z au niveau de la lysine 14, ce qui empêche son dépôt sur le promoteur du gène p21 et sa répression transcriptionnelle. P400 via une interaction directe, inhibe la fonction HAT de TIP60. Ce modèle souligne le rôle central de p400 dans le contrôle de la croissance cellulaire et l'inhibition de l'apoptose.



## 4-b- L'ATPase p400

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à l'ATPase p400. p400(EP400) est une ATPase qui appartient à la famille INO80 dont les membres sont impliqués dans la dynamique de la chromatine. Cette protéine a été découverte en 2001 grâce à son interaction avec l'oncoprotéine virale E1A (Fuchs et al., 2001). Au cours de ce travail, les auteurs ont cloné et caractérisé p400. Ils ont mis en évidence son appartenance au complexe Tip60 et ont montré que p400 appartient également à un complexe similaire au complexe Tip60, mais dépourvu de la protéine Tip60 : le complexe p400 (Fuchs et al., 2001). Dans le même travail, il a été mis en évidence, par analyse de séquence, que p400 porte le domaine catalytique SNF2 commun à toutes les ATPases participant au remodelage de la chromatine. De même, d'autres travaux ont permis d'isoler et de caractériser la protéine nommée « Domino », l'homologue de p400, nécessaire pour la survie et la prolifération cellulaire chez la drosophile (Ruhf et al., 2001). On retrouve également un homologue conservé de p400 dans d'autres organismes comme la levure *S. cerevisiae* appelé Swr1 (Kobor et al., 2004). p400 est impliquée dans le contrôle de plusieurs fonctions biologiques telles que le cycle cellulaire (Tyteca et al., 2006), l'inhibition de la sénescence (Chan et al., 2005) et l'apoptose (Mattera et al., 2009)



**Figure 12** : **A.** Structure du gène *p400* et de ses variants d'épissage chez l'homme. L'isoforme «canonique», la plus étudiée, est l'isoforme 2. **B.** L'ATPase de la famille SW2/SNF2, contient la région responsable de l'activité ATPase qui se caractérise notamment par le site de liaison à l'ATP. *p400* présente également 3 domaines Hélicases: HSA, DEXDc et HELICc.

## **b-1- Les caractéristiques structurales de p400**

Le gène codant pour p400 est situé sur le chromosome 12 en position q24.33 chez l'homme. Ce gène s'étend sur 130,5 kb et est constitué de 53 exons codant pour une protéine de 3122 acides aminés. L'ARNm majoritaire correspondant à ce gène compte 12,265 nucléotides. Il s'agit en fait de l'isoforme 2 de p400 qui correspond à la protéine p400 couramment étudiée. Trois autres isoformes générées par épissage alternatif ont été décrites ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) : l'isoforme 1 comporte une séquence normalement épissée dans l'intron 2, l'isoforme 3 ne comporte pas l'exon 4 et l'isoforme 4 a perdu l'exon 23 (Figure 12 A). En revanche, aucune confirmation expérimentale n'a été apportée à ce jour sur l'existence des protéines correspondantes à ces ARNm. On trouve également un pseudogène nommé « EP400 N-terminal like » (EP400-NL) sur le même locus codant théoriquement pour une protéine de 45kDa. Jusqu'à présent aucun travail ne fait mention de ce variant.

L'ATPase p400 contient les différents motifs qui constituent le domaine ATPase/Hélicase SNF2 retrouvé dans toutes les ATPases de la famille SW2/SNF2 (acides aminés 1057 à 1335). Par alignement de séquence, on retrouve trois autres domaines conservés dans la super famille des hélicases à savoir un domaine HSA (Helicase/SANT-associated ; acides aminés 763 à 834), un domaine DEXDc (Dead-like box Helicases C-terminal domain ; acides aminés 1074 à 1209) contenant le site de liaison de l'ATP (acides aminés 1082 à 1086) et enfin un domaine HELICc (Helicase C-terminal domain ; acides aminés 1854 à 1982). Les domaines HELICc et DEXDc forment le domaine ATPase de p400. Cette protéine présente une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Figure 12 B) (Hargreaves and Crabtree, 2011).

## **b-2- La localisation, expression et régulation de p400**

La présence de séquences de localisation nucléaire (NLS) dans la protéine p400 suggère une localisation nucléaire. Des travaux réalisés chez la souris montrent par immunofluorescence que mDomino (l'homologue de p400 chez cette espèce) est présent dans le noyau de fibroblastes embryonnaires (Ueda et al., 2007). Par une méthode de colocalisation avec la fibrillarine et le marquage au DAPI, il a été mis en évidence que le marquage ponctiforme de p400 est absent des zones denses d'hétérochromatine et des nucléoles. De plus, des expériences d'immunohistochimie (IHC) sur différents types de tissus humains révèlent un marquage nucléaire de la protéine ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). En ce qui concerne l'expression de p400, les travaux de Ueda et al, (2007) montrent par des

expériences de RT-PCR semi-quantitatives et d'hybridation *in situ*, que le cDNA correspondant à p400 est exprimé de manière ubiquitaire. Chez la souris, des données suggèrent un rôle important de p400 dans le développement et le processus d'hématopoïèse. Une délétion de la partie N-terminale de p400 est létale au stade embryonnaire (Ueda et al., 2007). De plus, l'analyse des embryons montre des défauts d'hématopoïèse probablement due à une expression altérée des gènes Hox.

Dans les cellules épithéliales humaines primaires du rein, il a été observé que le niveau d'ARNm de p400 diminue lors du maintien des cellules en culture. Cette diminution est corrélée avec l'induction de la sénescence (Young et al., 2008). Des expériences d'IHC montrent un marquage modéré et fort dans l'ensemble des tissus sains humains ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)).

### **b-3- L'activité enzymatique de p400**

Les remodeleurs de la chromatine de la famille swi2/snif2 comme p400, se caractérisent par la présence d'un domaine ATPase qui contrôle leur activité enzymatique. En effet, la mutation ponctuelle de p400 au niveau du site de liaison de l'ATP entraîne l'inactivation du complexe. Toutefois, lors de purification l'hétérodimère Tip49/Tip48 n'a jamais été dissocié de p400, de ce fait, aucune analyse de la fonction enzymatique de p400 seule n'a été réalisée. Des travaux montrent également que p400 permet l'incorporation de variants d'histones, notamment les variants H2A.Z et H3.3 (Gevry et al., 2007; Pradhan et al., 2016). Chez la drosophile, il a été montré que domino, l'homologue de p400, permet l'échange *in vitro* du variant de l'histone H2A, H2Av phosphorylé par un autre H2Av non modifié (Kusch et al., 2004). De même, chez la levure, *S. cerevisiae*, le complexe Swr1 contenant l'ATPase du même nom est capable d'échanger l'histone canonique H2A contre le variant H2A.Z (htz1 chez la levure) (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2003; Mizuguchi et al., 2004). Au cours de ces travaux, une étude à grande échelle du profil d'expression global des gènes, montre qu'environ 40% des gènes réprimés ou activés dans une souche mutante pour Swr1 (homologue de p400) sont régulés dans le même sens dans une souche mutante pour htz1 (homologue de H2A.Z). Ces observations ont permis aux auteurs de conclure que le complexe Swr1 est impliqué dans l'assemblage du nucléosome contenant le variant htz1. De même, grâce à l'usage d'un test *in vitro* avec des nucléosomes immobilisés sur billes, il a été mis en évidence un transfert du variant htz1 dans les nucléosomes lorsque le complexe Swr1 est incubé en présence de dimères htz1/H2B et d'ATP. Il faut noter que, dans ces études, aucun transfert de htz1 dans les

nucléosomes n'est observé lorsque Swr1 comporte une mutation dans le domaine de liaison à l'ATP, ce qui montre l'importance de l'activité ATPase de Swr1 dans la dynamique du nucléosome. Une analyse récente du génome entier soulève la possibilité que l'ATPase EP400 (p400) est nécessaire pour le dépôt du variant H3.3 dans le nucléosome lors de la transcription. Dans cette étude réalisée dans une lignée cellulaire humaine (U2OS) par CHIP-seq, il a été montré que p400 stimule le dépôt dans le nucléosome à la fois du dimère H2A.Z-H2B (donnée en accord avec les résultats de (Gevry et al., 2009)) et du tétramère (H3.3-H4)<sub>2</sub> (Pradhan et al., 2016). Dans une autre étude, il a été montré que p400 induit l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine au niveau du promoteur du gène p21 (Gevry et al., 2007). Au cours de ces études, il a été montré qu'une mutation dans le domaine de liaison à l'ATP empêche le dépôt du variant H2A.Z par p400, soulignant l'importance de son activité enzymatique pour ce processus.

#### **b-4- Implication du complexe p400 dans la réparation des DSB**

Les données concernant l'implication de p400 dans la réparation des DSB, sont peu nombreuses. Une étude réalisée en 2010 par l'équipe de Brendan D. Price, montre que p400 joue un rôle essentiel dans le recrutement des facteurs importants pour la réparation des DSB, parmi lesquels 53BP1 et BRCA1. Cette étude révèle notamment que p400 est nécessaire pour le remodelage de la chromatine au site de la DSB, qui favorise l'ubiquitination dépendante de RNF8 et le recrutement des facteurs tels que 53BP1 et BRCA1 (Xu et al., 2010). Une autre étude, réalisée en 2012 dans notre équipe, révèle un rôle de p400 dans la réparation des DSB par RH. Ainsi, il a été montré par CHIP dans les U2OS que la déplétion de p400 par siRNA entraîne un défaut de recrutement de RAD51 à la DSB. De même, en utilisant une lignée cellulaire de fibroblastes qui possède un substrat rapporteur pour mesurer la RH, il a été montré que la déplétion de p400 entraîne un défaut de réparation des DSB par RH (Courilleau et al., 2012). Chez la drosophile, (Kusch et al., 2004) Domino, l'homologue de p400 dans cette espèce, échange le variant d'histone H2Av phosphorylé par une forme non phosphorylée, une fois la réparation de la cassure terminée. Cet échange conduit à la suppression de la signalisation de la cassure préalablement mise en place.

#### **b-5- Rôle de p400 dans l'apoptose**

Des travaux montrent également l'implication de p400 dans l'apoptose. Dans une lignée tumorale humaine de colon, HCT116, le rapport p400/Tip60 semble contrôler la réponse aux dommages à l'ADN et l'induction de l'apoptose. En effet, cette étude propose que p400 et Tip60 fonctionnent, au moins en partie, comme un couple avec un effecteur (Tip60) et un

régulateur (p400). Dans ce couple, l'inhibition partielle de p400 par siRNA, favorise l'activité de Tip60, par conséquent la voie d'induction de l'apoptose dépendante de Tip60. En définitive, cette étude propose que p400 inhibe la voie d'induction de l'apoptose dépendante de Tip60 (Mattera et al., 2009). Par ailleurs, la liaison d'E1A à p400 est nécessaire pour déclencher l'apoptose par la voie p53-ARF, en réponse à des dommages à l'ADN ou à une privation en sérum. Cette étude montre que l'inhibition partielle de p400 par siRNA diminue les niveaux d'expression d'ARF et de p53 ainsi que l'apoptose des cellules exprimant E1A (Samuelson et al., 2005). D'autres travaux ont montré que la protéine E1A stabilise l'oncoprotéine myc via p400. Cette association induit le recrutement du complexe myc-p400 sur les promoteurs cibles pro-apoptotiques de myc, entraînant l'activation de leur expression (Tworkowski et al., 2008). Au sein de notre laboratoire, une étude a montré que p400 est requise pour l'apoptose induite par les UV dans les cellules U2OS. En effet, la déplétion de p400 entraîne la résistance des cellules à l'apoptose normalement induite par irradiation aux UV (Tyteca et al., 2006).

### **b-6- Rôle de p400 dans la sénescence**

Plusieurs travaux montrent que p400 peut réguler la prolifération cellulaire par l'inhibition du mécanisme de sénescence (Chan et al., 2005; Gevry et al., 2007; Macher-Goeppinger et al., 2013; Young et al., 2008). La sénescence est un mécanisme mis en place lorsque les cellules sont confrontées à un stress sévère comme les dommages à l'ADN ou la surexpression d'un oncogène. Dans de telles conditions, les voies dépendantes de p53 et de Rb sont activées entraînant l'arrêt irréversible du cycle cellulaire (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Dans une étude qui se focalisait sur la sénescence dépendante de la voie p53/p21, les auteurs ont montré que p400 régulait négativement la sénescence en diminuant l'expression de p21 en se localisant sur les sites de liaison de p53 dans le promoteur du gène p21, entrant ainsi en compétition avec p53 (Chan et al., 2005). D'autres travaux ont montré que p400, via le dépôt de H2A.Z au niveau des sites de liaison de p53 sur le promoteur du gène p21 joue un rôle important dans le contrôle de l'induction de la sénescence (Gevry et al., 2007). En effet, la déplétion de H2A.Z ou de p400 par shRNA dans les fibroblastes humains IMR90 induit la formation de foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF: senescence-associated heterochromatin foci). L'ATPase p400 est également impliquée dans la sénescence induite par l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *VHL*. Dans un modèle de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs), la perte de *VHL* induit la diminution de l'expression protéique de p400 en

parallèle de la mise en place du mécanisme de sénescence. De plus, ils montrent que la déplétion de p400 par siRNA induit l'accumulation d'un inhibiteur de CDKs, la protéine p27, ainsi que la sénescence (Young et al., 2008).

### **b-7- Rôle de p400 dans la prolifération cellulaire**

L'ATPase p400 est une cible privilégiée de l'oncogène E1A. En effet, lors d'une infection par l'adénovirus, p400 est ciblée par E1A pour servir son activité transformante (Fuchs et al., 2001). En plus, dans des cellules proliférantes non infectées, il a été montré que p400 est également recrutée sur les promoteurs de gènes cibles de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération comme E2F et myc (Frank et al., 2003; Taubert et al., 2004) et réprime la voie p53 p21 (Tyteca et al., 2006). L'ATPase p400, favorise aussi, la prolifération des cellules cancéreuses du côlon (les cellules HCT116) en induisant l'activité de la voie de signalisation Wnt (Chevallard-Briet et al., 2014). D'autres travaux montrent que la déplétion de p400 conduit à la perte de leurs caractéristiques morphologiques et à la diminution du taux de prolifération de cellules souches embryonnaires de souris (Fazio et al., 2008). L'ATPase p400 participe au contrôle de la prolifération cellulaire en régulant positivement les gènes cibles des œstrogènes via l'incorporation du variant H2A.Z, en réponse à un traitement hormonal (Gevry et al., 2009).

### **b-8- Rôle de p400 dans le cancer**

Plusieurs études révèlent que l'ATPase p400 pourrait être impliquée dans les cancers. La première montre le rôle de p400 comme cible dans la transformation cellulaire par l'oncoprotéine E1A de l'Adénovirus (Fuchs et al., 2001). En effet, un mutant de l'oncoprotéine E1A, ne pouvant plus interagir avec p400, est déficient pour son activité transformante dans des cellules embryonnaires de rat. En revanche la surexpression de p400 permet de restaurer cette activité et de la favoriser (Fuchs et al., 2001). La seconde étude, plus récente, met en évidence un rôle de p400 comme co-facteur de l'oncoprotéine E2 du papillomavirus (dont certains types HPV16 et 18 sont responsables des cancers du col de l'utérus) (Smith et al., 2010). En effet, p400 interagit avec l'oncoprotéine E2 et participe à la répression exercée par ce dernier sur les oncogènes E6 et E7 afin de permettre la « dormance » du virus dans les cellules. Le mécanisme moléculaire de cette répression n'a pas été caractérisé. Ces études suggèrent qu'une dérégulation positive (pour l'Adénovirus) ou négative (pour le papillomavirus) de p400 favoriserait l'activité tumorigène de ces virus et leur apporterait un avantage sélectif. La troisième étude montre que, le ratio p400/Tip60 contrôle la voie de réponse

aux dommages à l'ADN induite par un stress oncogénique. La dérégulation de ce ratio, dans les cellules de carcinomes colorectaux, entraîne une absence d'activation de cette barrière anticancer (Mattera et al., 2009). Récemment d'autres travaux, dont ceux de notre équipe, ont montré que p400 influence la réponse aux dommages à l'ADN et que son inhibition et/ou déplétion provoque des défauts de réponse aux dommages à l'ADN qui seraient la source d'instabilité génétique (Courilleau et al., 2012; Xu et al., 2010). Enfin, il a récemment été démontré chez la souris que p400 possède une fonction pro-oncogénique (Chevillard-Briet et al., 2014). Dans cette étude les auteurs montrent que la diminution d'expression de p400 est corrélée avec une baisse dans l'initiation et la progression du cancer du côlon.

L'instabilité génétique étant un facteur clé dans la génération mais aussi dans l'évolution des cancers on peut penser que p400 joue un rôle dans le maintien de la stabilité génétique et donc participe à la création d'une barrière anticancéreuse.



## **I-D- OBJECTIFS DE LA THESE**

L'objectif global de mes travaux de thèse était de comprendre comment la dynamique de la chromatine influence la réparation des DSB.

Pour cela, je me suis focalisé sur le remodeleur de la chromatine ATP-dépendant, p400 ainsi que sur le variant de l'histone H2A, H2A.Z. Ces deux protéines sont impliquées dans la dynamique de la chromatine et la réponse aux dommages à l'ADN. A travers des approches de biologie cellulaire et moléculaire j'ai essayé de comprendre leur rôle dans la stabilité génétique et la réparation des DSB.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai voulu déterminer le mécanisme par lequel l'ATPase p400 intervient dans la réparation des DSB par RH. J'ai ainsi examiné si la diminution de l'activité de réparation des DSB par RH, observée par Courilleau et al. en 2012, lors de la déplétion de p400 était due à un défaut d'incorporation du variant H2A.Z dans la chromatine.

Dans la seconde partie de ma thèse, l'objectif était de découvrir si et comment p400 influence les autres mécanismes de réparation des DSB comme le NHEJ, et si p400 intervient dans le contrôle de la stabilité du génome et la sensibilité aux agents endommageant l'ADN comme les radiations ionisantes.

## II-RESULTATS

### **II-A-Article 1: H2A.Z depletion impairs proliferation and viability but not DNA double-strand breaks repair in human immortalized and tumoral cell lines**

Gemael-Cedrick Taty Taty , Celine Courilleau, Muriel Quaranta, Alexandre Carayon, Catherine Chailleux, Francois Aymard, Didier Trouche & Yvan Canitrot

Cell Cycle. 2014;13(3):399-407. doi: 10.4161/cc.27143. Epub 2013 Nov 14.

#### **A-1-Introduction**

A mon arrivée dans l'équipe, il était connu, chez la levure et l'homme, que les enzymes de remodelage de la chromatine de la famille INO80, comme SWR1 chez la levure, p400 et SRCAP chez l'homme, étaient capables d'échanger l'histone canonique H2A par son variant H2A.Z dans le nucléosome (Mizuguchi et al., 2004; Xu et al., 2012). Chez la levure, SWR1, membre du complexe SWR, supprime le dimère H2A/H2B et le remplace par un autre dimère H2A.Z/H2B. Cette réaction est réversible, puisque le complexe INO80 a été décrit pour catalyser la réaction d'enlèvement de H2A.Z du nucléosome (Papamichos-Chronakis et al., 2011). Chez les mammifères, SRCAP et le complexe TIP60 via sa sous unité p400, ont également été décrits pour leur capacité à incorporer le variant H2A.Z dans le nucléosome (Xu et al., 2012), tout comme la chaperone YL1 identifiée récemment pour son interaction avec H2A.Z et sa participation au dépôt de H2AZ dans la chromatine (Lattrick et al., 2016; Liang et al., 2016). Cette réaction a récemment été décrite comme étant réversible, puisqu'il a été montré que, dans les cellules de mammifères, la protéine chaperone ANP32E est capable d'enlever le variant H2A.Z du nucléosome (Obri et al., 2014).

Dans l'équipe, il avait été montré que l'ATPase p400 influençait la réparation des DSB par RH (Courilleau et al., 2012). Au cours de ce travail, l'équipe avait montré que la déplétion de p400 par siRNA entraîne un défaut de réparation des DSB par RH car p400 est nécessaire pour le recrutement de la recombinaison RAD51 à la DSB.

Dans ce contexte, l'objectif de cette première partie de ma thèse a été de déterminer le mécanisme par lequel l'ATPase p400 intervient dans la réparation des DSB par RH. J'ai ainsi

examiné si la diminution de réparation des DSB par RH, observée lors de la déplétion de p400 résultait d'un défaut d'incorporation du variant H2A.Z dans la chromatine.

## **A-2-Résultats expérimentaux**

Afin d'étudier le rôle de H2A.Z dans la réparation des DSB j'ai utilisé, des lignées cellulaires humaines (GCS5 et GCV6) dans lesquelles est incorporé un substrat qui permet de mesurer les évènements de réparation par NHEJ (Figure 17 dans la partie matériel et méthodes). J'ai également utilisé, des cellules qui possèdent un système rapporteur qui permet de mesurer des évènements de réparation des DSB par RH (Figure 16 dans la partie matériel et méthodes). En utilisant ces lignées cellulaires, j'ai observé que la déplétion de H2A.Z par siRNA n'affecte ni les mécanismes de réparation des DSB (RH et NHEJ), ni la sensibilité aux radiations ionisantes. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de recrutement du variant H2A.Z aux DSB. Ceci suggère que le variant H2A.Z n'est pas impliqué dans les mécanismes de réparation des DSB. Cependant, une autre étude avait analysé le rôle de H2A.Z dans la réparation des DSB chez les mammifères (Xu et al., 2012) et montrait que l'expression de H2A.Z était importante à la fois pour la RH et le NHEJ et que la déplétion de H2A.Z induisait une sensibilité accrue aux radiations ionisantes. Une autre étude plus récente (Alatwi 2015) montre que H2A.Z est recruté rapidement et transitoirement à la cassure et que son éviction par INO80 est nécessaire au bon déroulement de la réparation par RH.

Nos résultats sont en contradiction avec ces observations car nous n'observons aucun effet de la déplétion de H2A.Z sur les mécanismes de réparation des DSB, ni sur le recrutement de H2A.Z aux DSB. Les possibles raisons de ces différences seront développées en détails dans la partie discussion de ce manuscrit.

Nos résultats montrent cependant un phénotype cellulaire lorsque l'expression de H2AZ est diminuée. En effet, H2A.Z semble impliqué dans la progression du cycle cellulaire puisque, sa déplétion entraîne une accumulation des cellules en phase G1 dans les U2OS et une accumulation en phase G2/M dans les fibroblastes RG37. La différence observée entre les deux lignées cellulaires pourrait être la conséquence de leur statut p53 qui est différent.

En effet, p53 est "sauvage" dans la lignée U2OS alors qu'il est inactif dans la lignée RG37 à cause de la présence de l'antigène grand T du virus SV40 qui a servi à immortaliser la lignée.

L'incorporation du variant H2A.Z dans le promoteur du gène p21 bloque son expression (Gevry et al., 2007). Dans les cellules U2OS, l'inhibition partielle de H2A.Z par siRNA favorise l'expression de p21. Dans ces conditions, p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 via

p21. Dans les fibroblastes RG37, la voie de p53 est inactive et la déplétion de H2A.Z bloque alors le cycle en G2/M.

## **Conclusion**

La première partie de mes travaux de thèse suggère que dans nos cellules et dans nos conditions, le variant H2A.Z n'est pas directement impliqué dans le contrôle des mécanismes de réparation des DSB (RH et NHEJ). Au vu des précédents travaux réalisés, le rôle de H2A.Z dans la réparation des DSB reste controversé. Néanmoins, nos résultats révèlent une implication de H2A.Z à la fois, dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire, et dans le contrôle de la capacité des cellules à former des clones. La réponse à la question de savoir si la diminution de réparation des DSB par RH, observée lors de la déplétion de p400 est due à un défaut d'incorporation du variant H2A.Z dans la chromatine n'est pas clairement tranchée. Cette première partie de mes travaux soulève la question de savoir si et comment le variant H2A.Z est impliqué dans les mécanismes de réparation des DSBs ? La réponse à cette interrogation est débattue dans la partie discussion et perspectives.

# H2A.Z depletion impairs proliferation and viability but not DNA double-strand breaks repair in human immortalized and tumoral cell lines

Gemaël-Cedrick Taty-Taty<sup>1,2</sup>, Celine Courilleau<sup>1,2</sup>, Muriel Quaranta<sup>1,2</sup>, Alexandre Carayon<sup>1,2</sup>, Catherine Chailleux<sup>1,2</sup>, François Aymard<sup>1,2</sup>, Didier Trouche<sup>1,2,†,\*</sup>, and Yvan Canitrot<sup>1,2,†,\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Toulouse; UPS; LBCMCP; Toulouse, France; <sup>2</sup>CNRS; LBCMCP; Toulouse, France

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**Keywords:** chromatin, H2A.Z, p400, DNA repair, homologous recombination, NHEJ

In mammalian cells, DNA double-strand breaks (DSB) can be repaired by 2 main pathways, homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ). To give access to DNA damage to the repair machinery the chromatin structure needs to be relaxed, and chromatin modifications play major roles in the control of these processes. Among the chromatin modifications, changes in nucleosome composition can influence DNA damage response as observed with the H2A.Z histone variant in yeast. In mammals, p400, an ATPase of the SWI/SNF family able to incorporate H2A.Z in chromatin, was found to be important for histone ubiquitination and BRCA1 recruitment around DSB or for HR in cooperation with Rad51. Recent data with 293T cells showed that mammalian H2A.Z is recruited to DSBs and is important to control DNA resection, therefore participating both in HR and NHEJ. Here we show that depletion of H2A.Z in the osteosarcoma U2OS cell line and in immortalized human fibroblasts does not change parameters of DNA DSB repair while affecting clonogenic ability and cell cycle distribution. In addition, no recruitment of H2A.Z around DSB can be detected in U2OS cells either after local laser irradiation or by chromatin immunoprecipitation. These data suggest that the role of H2A.Z in DSB repair is not ubiquitous in mammals. In addition, given that important cellular parameters, such as cell viability and cell cycle distribution, are more sensitive to H2A.Z depletion than DNA repair, our results underline the difficulty to investigate the role of versatile factors such as H2A.Z.

## Introduction

The genome is continuously the target of numerous internal and external agents that produce a large diversity of DNA lesions.<sup>1,2</sup> In order to maintain cell viability and avoid the generation of mutations, cells have evolved specific DNA repair processes designed to take into account the different DNA damages.<sup>1,2</sup> Among the most deleterious DNA damages, the presence of DNA double-strand breaks (DSB) is a challenge for the cells. To deal with the presence of DSB, mammalian cells use 2 well-characterized DNA repair pathways, homologous recombination (HR), which is dependent on the presence of the intact homologous copy and by the way of the cell cycle, and the non-homologous end joining (NHEJ) pathway, which performs the direct ligation of the 2 DNA ends.<sup>3,4</sup>

The repair of DNA damage takes place in a chromatin context.<sup>5</sup> Chromatin is a complex structure that can undergo numerous modifications in order to give or to repress access to DNA regions and site. Chromatin structure can be modified by post-translational modifications of histones but also by changing

the nucleosome positioning or composition.<sup>6,7</sup> This last process involves ATP-dependent chromatin remodelers, which use the hydrolysis of ATP as energy source to incorporate histone variants in chromatin.<sup>8</sup>

Histone variants are critical for DSB management and repair is known for long through studies of the histone variant H2AX, which is quickly phosphorylated in response to DSB induction and gives rise to visible repair foci composed of signaling and repair proteins.<sup>9</sup>

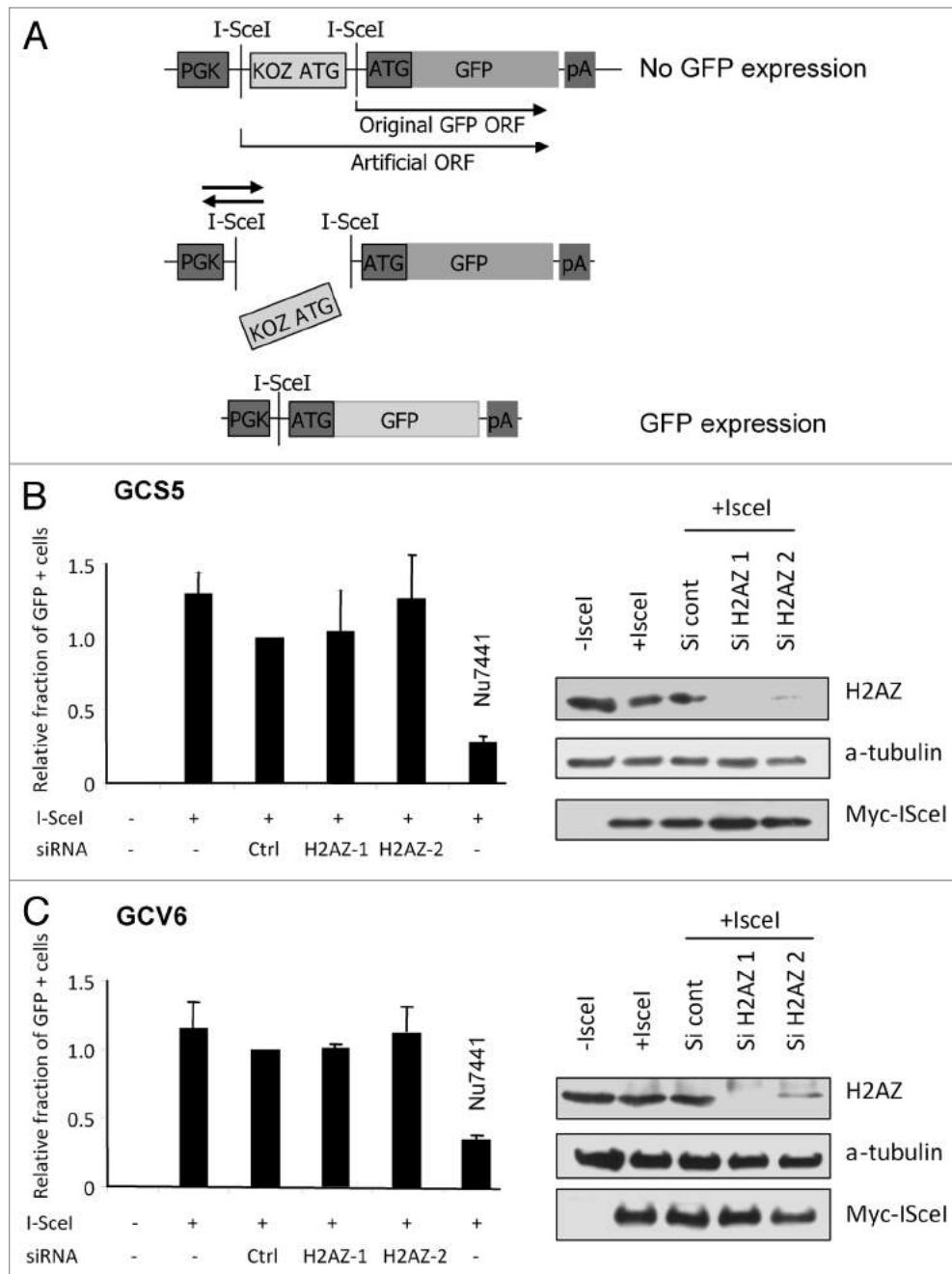
The only histone H2A variant conserved from yeast to human is the H2A.Z variant. It is incorporated in yeast by the SWR1 enzyme and evicted from nucleosome by the INO80 enzyme.<sup>10</sup> In humans H2A.Z variant is incorporated by the p400 or SRCAP enzymes, both related to SWR1. The role of H2A.Z in DSB repair has been studied in yeast,<sup>11</sup> and whether it is recruited to DSB is still a matter of debate. Recent data show that it is recruited at a very short period of time during DSB repair, except if the breaks cannot be repaired properly.<sup>11</sup> The disruption of the H2A.Z-encoding genes leads to genomic instability, defects in DSB repair, in particular in DNA resection,<sup>12</sup> and sensitivity

\*Correspondence to: Didier Trouche; Email: didier.trouche@univ-tlse3.fr; Yvan Canitrot; Email: yvan.canitrot@univ-tlse3.fr  
Submitted: 08/02/2013; Revised: 11/08/2013; Accepted: 11/10/2013  
<http://dx.doi.org/10.4161/cc.27143>

to DNA damaging agents,<sup>13</sup> although it is not clear whether it is due to direct effects of H2A.Z around DSBs, or to the global deregulation of genes expression observed upon H2A.Z inactivation<sup>10</sup> or to indirect effect resulting from the attempt to replace H2A with H2A.Z in the absence of the latter<sup>14</sup>

In higher eukaryotes, the role of H2A.Z has mainly been investigated by studying the enzymes able to incorporate H2A.Z in chromatin. In plants, SWR1 is important for the process of

HR and for meiosis exit, although in this latter process, it seems to be important for later steps other than HR.<sup>15</sup> In mammals, one study showed that p400 is recruited to DSBs and is important for histone ubiquitination around DSB, leading to BRCA1 and 53BP1 recruitment.<sup>16</sup> The authors propose that the chromatin remodeling activity of p400 favors the action of ubiquitin ligases on nucleosomal histones. In contrast, we found that p400 depletion does not affect histone ubiquitination but is specifically



**Figure 1.** Effect of H2A.Z depletion on DSB repair by NHEJ (A) Schematic representation of the NHEJ substrate present in the cell lines. The translation of the GFP gene is suppressed by an upstream, out of frame translation start site (KOZ ATG), the cassette is flanked with 2 I-SceI sites. I-SceI expression induces the release of the Koz ATG and religation of DNA ends allows translation and expression of GFP (B) GCS5 and (C) GCV6 cells were transfected with siRNA (10 nM) then, 24 h later, transfected with I-SceI coding plasmid to induce DSB. Treatment with Nu7441 was performed at 5  $\mu$ M during 48 h at the time of I-SceI transfection. NHEJ events were counted 48 h later by FACS analysis of GFP-positive cells. Results are the mean  $\pm$  sd from 3–5 independent experiments. Western blots monitoring the indicated proteins expression are also shown.

important at later steps of the process of HR as a co-factor for Rad51<sup>17</sup>: p400 binds to Rad51, and both proteins are important for chromatin remodeling around DSBs. The reasons for the discrepancies between the 2 studies are not clear.

A recent study has directly investigated the role of H2A.Z around DSB in human 293T cells. The authors found that H2A.Z is recruited to DSBs using ChIP approach in a p400-dependent manner around a unique DSB induced by a Zn finger nuclease.<sup>18</sup> Moreover, the depletion of H2A.Z by specific shRNAs led to genomic instability and increased sensitivity to ionizing radiations.<sup>18</sup> In addition the authors used GFP-based reporter systems to measure the activity of various repair pathways, and found that H2A.Z depletion impaired both HR and NHEJ. They further demonstrate that H2A.Z depletion leads to an increased DNA resection, and propose that the role of H2A.Z is to block the CtIP-dependent resection.

Here, we investigate the role of H2A.Z in DSB repair in a human osteosarcoma cell line and in human fibroblasts immortalized by the large T antigen from SV40. We did not

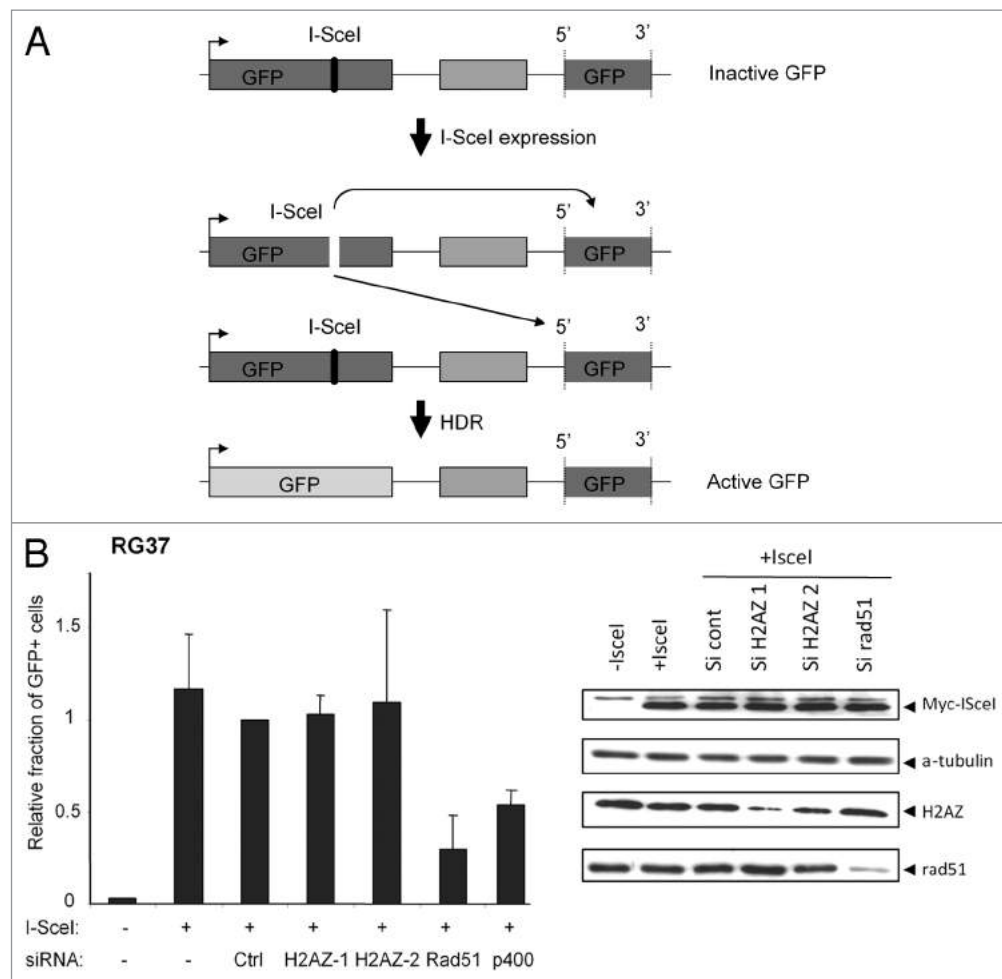
find any effect of partial H2A.Z depletion on various DSB repair parameters, although H2A.Z depletion led to changes in cell viability and cell cycle phase distribution. In addition, we did not find any evidence for H2A.Z recruitment at DSB. Our data thus suggest that the role of H2A.Z in DSB management in mammals is not ubiquitously observed.

## Results

### H2A.Z depletion does not impair repair of DSB by homology directed repair or NHEJ

We recently showed that the depletion of the p400 ATPase impairs homology-driven repair of DNA DSBs in RG37 fibroblasts. P400 mediating the incorporation of H2A.Z in chromatin, we examined the potential role of H2A.Z in DSB repair using a siRNA approach.

One of the major pathways for repairing DSBs is the non-homologous end joining (NHEJ) process, a DNA repair pathway acting in all cell cycle phases and not requiring sequence



**Figure 2.** Effect of H2A.Z depletion on homology-directed repair of DSB. **(A)** Schematic representation of the substrate present in the cells to measure DSB repair mediated by homologous recombination. Two inactive copies of GFP gene are present: one contains the cleavage site for I-SceI; the other one is truncated at the 5' and 3' ends. After cleavage intra- or interchromatid use of the truncated form of GFP to repair DSB generates functional GFP. **(B)** RG37 cells were transfected with the different siRNA (10 nM), then, 24 h later, transfected with I-SceI plasmid to induce DSB. HDR efficiency was evaluated 48 h later by FACS analysis. Results are the mean  $\pm$  SD from 4 independent experiments. Western blots monitoring the indicated proteins expression are also shown (western blot monitoring the effects of p400 depletion are shown in ref. 17).

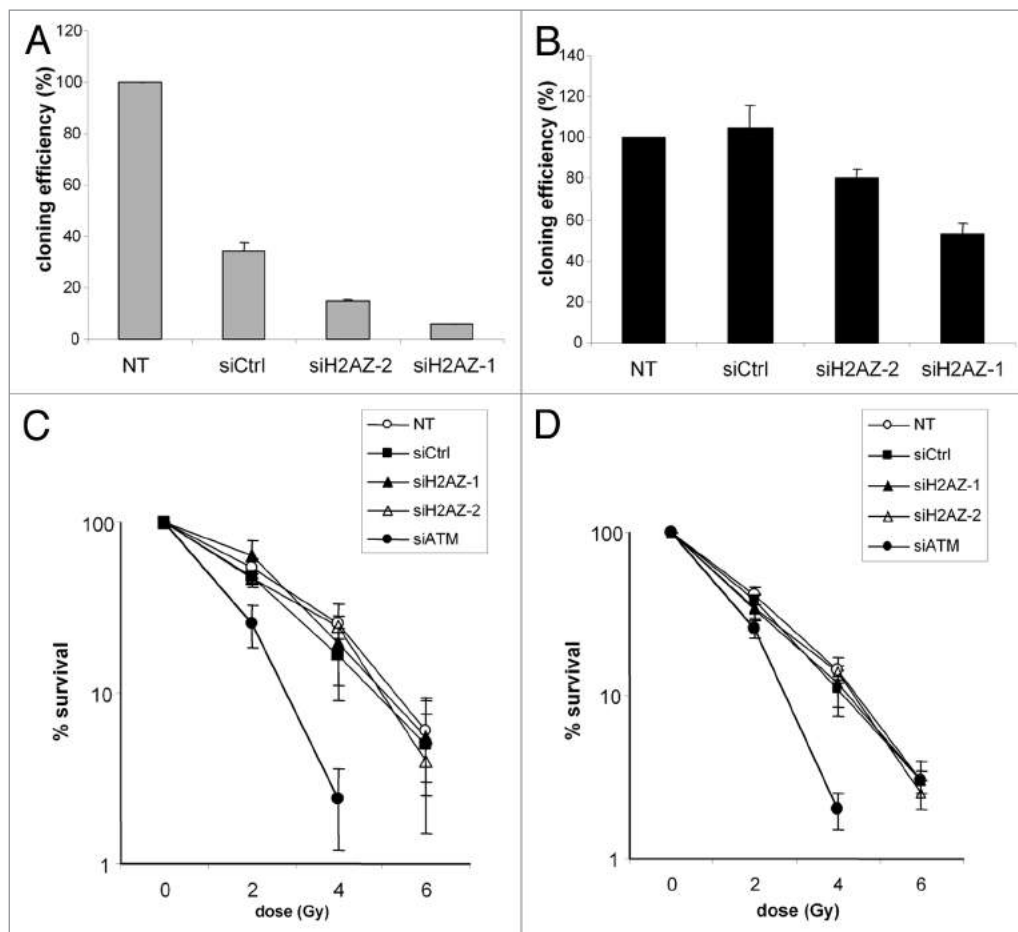


homology. To investigate the efficiency of NHEJ-mediated repair, we made use of 2 cell lines derived from normal fibroblasts immortalized by the T antigen from SV40. These cell lines harbor specific substrates allowing to measure NHEJ efficiency by assessing the number of GFP-positive cells following expression of the I-SceI endonuclease.<sup>19</sup> I-SceI-mediated digestion leads either to fully cohesive ends (GCS5, upper panel) or partially cohesive ends requiring processing before ligation (GCV6, lower panel).<sup>19</sup> Transfection with 2 different H2A.Z siRNAs leads to the decrease of H2A.Z expression, with H2A.Z-1 being more efficient than the H2A.Z-2 (Fig. 1A and B). Moreover, such a depletion of H2A.Z expression leads to a decrease in H2A.Z presence in chromatin (Fig. S2). We observed in both cell lines that depletion of H2A.Z does not influence the repair of DSB by NHEJ, assessed by the percentage of GFP-positive cells (Fig. 1A and B). As a positive control affecting NHEJ activity we treated cells with the DNA-PKcs inhibitor, Nu7441.<sup>20</sup> Thus, the depletion of H2A.Z in these cell lines does not affect the repair of I-SceI-induced DNA breaks by NHEJ, irrespective of whether these breaks need to be processed before ligation or not.

In addition to NHEJ, DSB can also be repaired by homologous recombination (HR), a pathway active in S and G<sub>2</sub>

in which the genetic information of the sister chromatid serve as a template to repair the DSB. We used a cell line (RG37) derived from the same original immortalized cell line than the GCS5 and GCV6 but harboring a GFP-based substrate, allowing the measurement of HDR (homology directed repair, a process highly related to HR). We transfected RG37 cells with the 2 different siRNA directed against H2A.Z. The H2A.Z-1 siRNA shows again higher efficiency than the H2A.Z-2, both at the protein and mRNA levels (Fig. 2A). As a positive control, we used an siRNA directed against Rad51, a key component of the HR process. Depletion of H2A.Z does not affect the frequency of the homology-directed repair of DSB (assessed by counting the percentage of GFP-positive cells), whereas depletion of Rad51 leads to an approximately 70% decrease and p400 depletion to around 50% as previously observed in the same cellular system<sup>17</sup> (Fig. 2B). These results indicate that H2A.Z depletion by siRNA does not influence DSB repair by HR.

Since using siRNA we only achieve a partial H2A.Z depletion, we cannot rule out the possibility that such depletion is not sufficient to observe any effect. However, trying to increase the efficiency of H2A.Z depletion by a second round of siRNA



**Figure 3.** Clonogenic survival of IR exposed cells after H2A.Z depletion. U2OS cells transfected with the different siRNA were (A) plated to evaluate clonogenic efficiency or (C) exposed to ionizing radiations 24 h later and clonogenic assay performed. The same protocol was applied with the RG37 cells (B) to evaluate clonogenic efficiency and (D) to examine cell survival after ionizing radiations exposure. Colonies were revealed 10 d later by staining the plates with crystal violet. Results are the mean $\pm$ sd of triplicate.

transfection leads to an important cellular toxicity (data not shown), and results could not be interpreted.

#### H2A.Z depletion influence on cell survival to DNA damage

We next analyzed the role of H2A.Z in cell survival following DNA damage by performing clonogenic assay in p53-positive U2OS cells in response to ionizing radiations. We observed that without irradiation, in siCtrl treated-cells the cloning efficiency is 10% (whereas in untreated cells, the cloning efficiency is 30%) and decreases under 5% in H2A.Z-depleted cells (4% in siH2A.Z-2 treated cells and 2% in siH2A.Z-1 treated cells) (Fig. 3A; Fig. S1). Given that these effects are observed with 2 independent siRNAs and are higher with the siRNA leading to the stronger depletion, we conclude from these observations that depletion of H2A.Z per se is detrimental to cell viability and proliferation. The strong effect observed in siCtrl-treated cells is certainly due to the high sensitivity of this cell line to the transfecting reagent, because it is also observed using another control siRNA (data not shown). Moreover, such an effect is not observed in the other cell line (RG37) with the same siRNA and transfecting reagent. These results are in accordance with our previous observation that 2 rounds of transfection with H2A.Z siRNA are very detrimental for cell life. Importantly, they indicate that the depletion of H2A.Z we achieved using both siRNA is sufficient to observe a phenotype (cell clonogenic ability).

Strikingly, examination of normalized cell survival showed that H2A.Z depletion did not sensitize cells to ionizing radiations exposure (Fig. 3C), in agreement with the fact that we do not observe any effect of such depletion on the 2 main DSB repair pathways. Similar results were obtained in RG37 cells, the cell line we used for measuring HDR repair in Figure 2 (Fig. 3B and D). However, the effect of H2A.Z depletion on clonogenic efficiency was less pronounced in the RG37 cells than in U2OS cells (Fig. 3B; Fig. S1). The differences of clonogenic efficiency after H2A.Z depletion between the 2 cell lines could result from the different p53 status of each cell line.

We conclude from these experiments that in U2OS osteosarcoma cells and in immortalized fibroblasts, we do not observe any effect of H2A.Z depletion on DSB repair properties in conditions in which cell clonogenicity is affected.

#### H2A.Z depletion influence on cell cycle progression

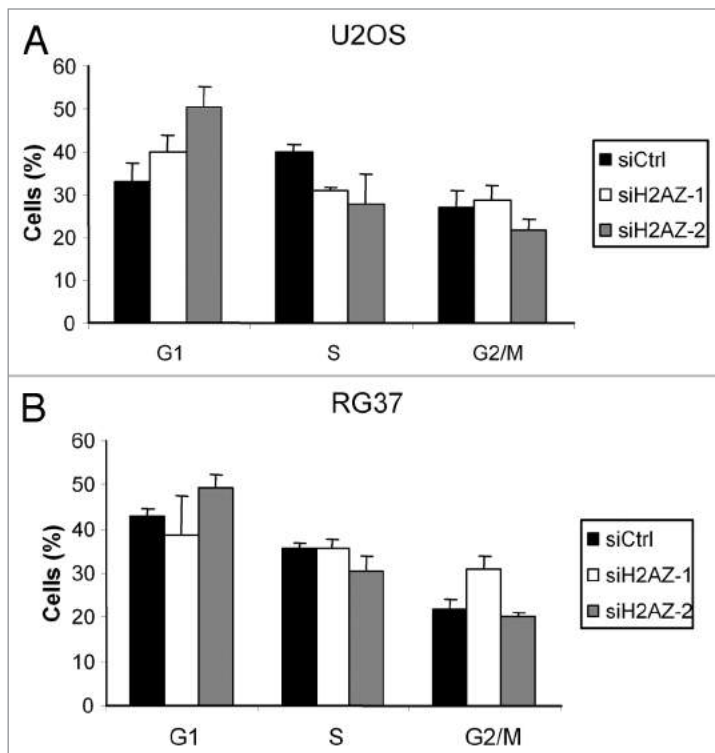
The lack of effect of H2A.Z depletion on DSB repair conducted us to evaluate the efficiency of our siRNA on different cellular functions potentially affected by H2A.Z. To this aim, we next investigated the mechanism leading to the decreased clonogenic potential upon H2A.Z depletion. A defect in H2A.Z incorporation at the cell cycle control p21 gene promoter induces the expression of p21 and cell cycle arrest.<sup>21</sup> Thus, H2A.Z depletion could have a significant effect on cell cycle progression. We thus analyzed cell cycle distribution of U2OS and RG37 cells following transfection of the H2A.Z siRNAs by flow cytometry. We found that, consistent with the induction of p21, H2A.Z depletion with the 2 H2A.Z siRNA induces an accumulation of U2OS cells in G<sub>1</sub> and a decrease in the number of cells in S phase

(Fig. 4A). In RG37 cells, we observed an increase number of cells in G<sub>2</sub> phase and a decrease in the number of G<sub>1</sub> and S phase cells, at least using the H2A.Z-1 siRNA (such an increase was sometimes but not consistently observed for the H2A.Z-2 siRNA, probably because its depleting effect was too low [Fig. 4B]).

Thus, in these 2 cell lines, H2A.Z depletion affects cell cycle distribution, the difference between them being probably the consequence of their p53 status. Indeed, in U2OS cells, H2A.Z depletion induces a p53-dependent cell cycle arrest in G<sub>1</sub> through the induction of p21. In contrast, RG37 cells, being immortalized by T antigen expression that inactivates p53, cannot undergo this p21-dependent cell cycle arrest.

#### H2A.Z does not accumulate at DNA damage site

Because we could not find any effect of H2A.Z depletion on DSB repair, we addressed the role of H2A.Z in DSB repair by investigating whether it could be recruited to DSBs. To that purpose, we first used live imaging after laser-induced DNA damage on U2OS cells expressing GFP-tagged H2A.Z to follow whether H2A.Z accumulates at sites of DNA damage. Image recording showed that H2A.Z presents low mobility in the nucleus as observed after photo bleaching, since the bleached area was still observable 9 min following irradiation (Fig. 5B). Strikingly, no recruitment or accumulation was observed at the site of DNA damage at any time points following irradiation (Fig. 5B). This is in strong contrast with what happens in the same conditions using GFP-tagged 53BP1, for which recruitment and accumulation on DNA damaged regions was observed as



**Figure 4.** Effect of H2A.Z depletion on cell cycle distribution. Cell cycle distribution was examined by flow cytometry in U2OS (A) and RG37 (B) cells 48 h after siRNA transfection and staining with propidium iodide. Results are the mean  $\pm$  sd from 3 independent experiments.

soon as 5 min post-DNA damage induction, as evidenced by 53BP1 foci formation (Fig. 5A). Thus, no recruitment of H2A.Z can be observed in this experimental setting. In addition, we tested 53BP1-GFP recruitment after p400 depletion following laser induced irradiation in U2OS cells. The results obtained do not show significant alteration of 53BP1 recruitment at damaged areas (Fig. 5C). Similar results were obtained using MEF p400 (+/-) and p400 (+/+) from transgenic mice (data not shown). Such a result is consistent with our previous finding that 53BP1 foci formation upon ionizing radiation exposure is not defective in p400-depleted cells<sup>17</sup>.

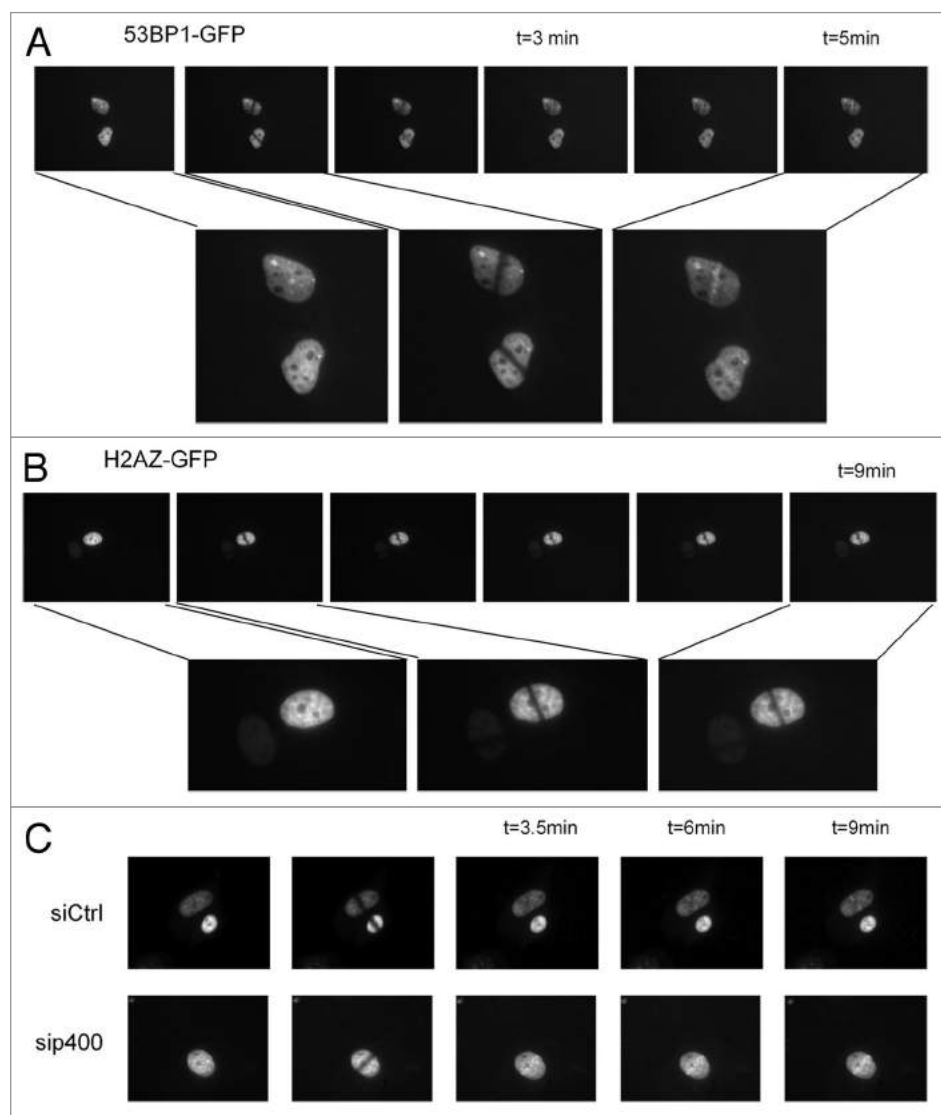
Given that the GFP moiety could affect DSB recruitment of H2A.Z, we also performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments in U2OS cells in which sequence-specific DSBs can be induced by the A/SiSI restriction enzyme following

hydroxyl-tamoxifen (OH-Tam) treatment.<sup>22</sup> By this technique, the presence of the phosphorylated form of H2AX was detected after OH-Tam addition around the 3 A/SiSI sites we tested, revealing the efficiency of DNA breaks induction and of ChIP analyses (Fig. 6A). Using an antibody directed against endogenous H2A.Z, we detected the presence of H2A.Z near the 3 A/SiSI sites as well as from the positive control p21 promoter (data not shown), indicating that the H2A.Z ChIPs are efficient. However, the presence of H2A.Z near the 3 A/SiSI sites is similar in the absence or in the presence of A/SiSI-induced DNA breaks (Fig. 6A), indicating that, in such experiments, no de novo recruitment of H2A.Z could be detected. Finally, as a control of the efficiency of the ChIP experiment using H2A.Z antibody, we performed ChIP after H2A.Z depletion and we observed a decrease in the H2A.Z signal, confirming that our experimental setting was able to detect changes in H2A.Z levels (Fig. S2).

## Discussion

Here, we investigate the role of the histone variant H2A.Z in DNA double-strand break repair in mammals. We do not observe any defect of DNA DSB repair upon partial H2A.Z depletion. In addition, we do not find any evidence for H2A.Z recruitment around DSBs.

Until recently, work in mammals had focused on the H2A.Z chaperone p400. Depletion of the p400 ortholog in yeast leads to NHEJ defects but not HR defects.<sup>13</sup> In contrast, in mammals, depletion of p400 by siRNA or the use of a dominant-negative mutant of p400 impairs homologous recombination-related steps, such as the formation of BRCA1 foci.<sup>16,17</sup> We have shown that p400 interacts with the HR-specific protein Rad51 and impairs Rad51-dependent steps, whereas another study showed that p400 regulates histone ubiquitination and thus BRCA1 recruitment.<sup>16</sup> However, although both studies clearly demonstrated the involvement of the ATPase activity of p400, the role of H2A.Z in mammals was directly investigated only recently. Our data shows that the phenotype observed upon p400 depletion and upon H2A.Z depletion are very distinct: for example, in the same cell type (RG37), p400 depletion induces a defect in HDR without affecting cell cycle,<sup>17</sup> whereas H2A.Z depletion induces



**Figure 5.** Analysis of H2A.Z recruitment on DNA damage in living cells. Nucleus of U2OS cells transfected with 53BP1-GFP (A) or H2A.Z-GFP (B) plasmids were irradiated with pulsed laser (532 nm) to induce DNA damage then images were collected sequentially. (C) Nucleus of U2OS cells first transfected with siCtrl or sip400 then transfected with 53BP1-GFP plasmid and irradiated to induce DNA damage as in (A). Time after irradiation is indicated above the photographs.

changes in cell viability and cell cycle distribution ( $G_2$  arrest) without affecting HR (this study). This result indicates that depleting a histone variant chaperone does not necessarily give insights into the role of this histone variant. Such discrepancy could be due to H2A.Z-independent roles of p400, for example as a structural component of the Tip60 complex or as chromatin remodeling factor, favoring acetylation of nucleosomes by p400. In addition, as previously demonstrated in yeast for which *htz1*-specific phenotypes are due to SWR1 becoming detrimental,<sup>14</sup> we might suppose that p400 expression and activity could become detrimental to the cell without its substrate (H2A.Z). This could explain the reason why it was not possible to obtain stable clones overexpressing p400 in human cell lines such as U2OS, RG37, and HeLa (unpublished data).

The role of mammalian H2A.Z in DSB repair was recently addressed by Xu et al.<sup>18</sup> They showed that H2A.Z expression is important both for HR and NHEJ, H2A.Z depletion leading to a decrease in cell survival upon ionizing radiations exposure. They propose that H2A.Z-containing nucleosomes function as a barrier to block CtIP activity and, consequently, DNA resection. In their model, H2A.Z exchange would be necessary for the acetylation and ubiquitination of histones in order to promote BRCA1 loading but also required for loading of the NHEJ repair protein Ku70/Ku80. Our results stand in contrast with that finding. Indeed, we do not find any repair defect in the absence of H2A.Z, assayed either by cell viability following irradiation or using reporter systems for NHEJ or HR. One major difference between both studies is the way to achieve H2A.Z depletion. Xu et al. used shRNA, leading to a long-term and very strong depletion, as shown by western blot, whereas we only achieved a partial decrease in H2A.Z expression. However, despite this partial decrease, we can observe phenotypes induced by H2A.Z depletion such as basal clonogenic activity and cell cycle defects, indicating that major changes in cell metabolism can be observed upon partial H2A.Z depletion, at least in our cells. Given the strong connections between cell cycle distribution and the repair of DSB, changes in cell cycle distribution preclude any correct interpretation of DSB repair assays. Strikingly, Xu et al. did not find any evidence for an effect of H2A.Z depletion on cell cycle distribution. Clearly, these data indicate that depending on the cell type, depletion of H2A.Z leads to different phenotypes, with cell cycle changes being observed in U2OS and T-immortalized fibroblasts, and defects in DSB repair in HEK-293T cells. The reasons for these differences are still obscure, since 293T and T-immortalized fibroblasts both expressing the large T antigen from SV40 virus, inactivating both p53 and Rb.

Similarly, we did not find any evidence for H2A.Z recruitment to DSB in U2OS cells, either using laser-induced DNA breaks or by chromatin immunoprecipitation following sequence-specific DNA breaks. Local laser-induced irradiation data also indicate that H2A.Z is not very mobile, even following irradiation. This result suggests that the recruitment of H2A.Z to DNA breaks is perhaps restricted to

a very short period of time, as proposed in yeast,<sup>11</sup> or not very important in quantity or also specific to some cell types. Clearly, understanding why H2A.Z requirement is restricted to some particular DSB is a major issue in the field.

## Materials and Methods

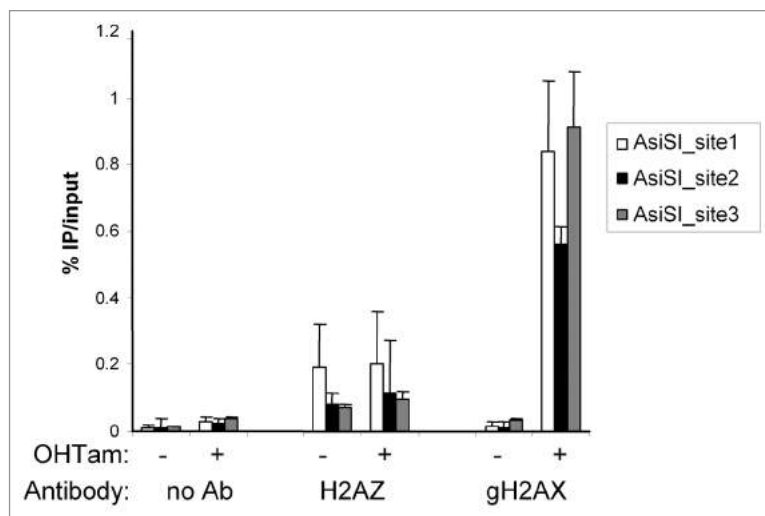
### Cell culture and transfections

The RG37, GCS5, and GCV6 cell lines have been derived from SV40 T-transformed GM639 human fibroblasts.<sup>23</sup> RG37, GCS5, GCV6, and U2OS cells were grown at 37 °C in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with antibiotics, 10% FCS (all from Invitrogen). The AsiSI-ER-U2OS stable cell line<sup>22</sup> was cultured in DMEM medium supplemented with 10% FCS and antibiotics. When needed, 300 nM of 4OH-tamoxifen was added to culture medium for 4 h. Treatment with the DNAPK inhibitor Nu7441 (Selleckchem) was performed at 5  $\mu$ M 1 h before transfection with I-SceI and maintained during 48 h until harvesting the cells for GFP detection.

For siRNA transfection,  $1 \times 10^5$  cells were transfected with siRNA (10 nM) using Interferin (Ozyme) according to the manufacturer's instructions or  $5 \times 10^6$  cells were electroporated with siRNAs (10  $\mu$ M) using an electroporation device (Amaxa AG), according to manufacturer's specifications (for all other experiments). Plasmids were transfected with Jet-PEI (Ozyme) according to the manufacturer's indications.

### Western blot

Total cell lysates were prepared by the resuspension of the cells directly in Laemmli buffer and sonication. Cells extracts were separated on 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane. Primary antibodies as well as peroxidase-conjugated secondary antibodies were used according to standard western blot procedure and peroxidase activity was detected by using the Lumi-LightPLUS Western Blotting Substrate (Roche Diagnostics). The antibodies used were anti



**Figure 6.** Chromatin immunoprecipitation of H2A.Z at DNA double-strand break. ChIP experiment showing H2A.Z and gH2AX accumulation at DSB in AsiSI-ER-U2OS cells.



H2A.Z from Abcam, gH2AX from Epitomics,  $\alpha$ -tubulin from Sigma-Aldrich, anti myc from Roche (9E10).

#### Assay for homology directed repair (HDR)

RG37 cells were transfected with the different siRNA (10 nM) then 24 h later transfected with I-SceI coding plasmid, and 48 h later cells were washed with PBS and treated with trypsin. Cells were resuspended in PBS and HDR was measured by the quantification of the GFP-positive cells by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson). Quantification was performed on  $25 \times 10^3$  sorted events.

#### Assay for non-homologous end joining repair

GCS5 and GCV6 cells were transfected with the different siRNA (10 nM) then 24 h later transfected with I-SceI coding plasmid, and 48 h later cells were washed with PBS and treated with trypsin. Cells were resuspended in PBS and NHEJ events were quantified as GFP-positive cells by flow cytometry. Quantification was performed on  $25 \times 10^3$  sorted events.

#### Laser microirradiation for the generation of DNA damage and live cell imaging

The system used to perform laser-induced DNA damage is composed of a conventional inverted microscope (DMI6000B; Leica) equipped with a heated stage and covered with an incubation system including a temperature controller and CO<sub>2</sub> flow system. DNA damage induction on nucleus was achieved with a frequency-doubled Nd:YAG-pulsed laser at a wavelength of 532 nm; the pulse was estimated to have a duration of 600 ps with a repetition rate of 10 kHz (532-nm Sealed Green Microchip; JDS Uniphase). The guiding of the beam was performed using an L5D head (Roper Industries) coupled to the microscope through the epifluorescence port. The beam is focused with a 100  $\times$  NA 1.4 Plan Apo oil immersion objective lens (HCS; Leica). Images were acquired with a cooled charge-coupled device camera (CoolSNAP HQ2). The system is driven by MetaMorph software.

Live cells analysis was performed in a 2-well chamber (Labtek) in 1 ml of optimum medium without red phenol on cells transiently transfected with H2A.Z-GFP or 53BP1-GFP constructs. Images were recorded using the MetaMorph software package (MDS Analytical Technologies).

#### ChIP experiments

Cells were fixed in 1% formaldehyde (20 min) and glycine added to block the reaction. ChIPs were performed as described<sup>24</sup> using 150  $\mu$ g of chromatin. Nuclei were prepared and sonicated to generate DNA fragments with lengths between 500 and 1000 bp. After pre-clearing and blocking steps, immunoprecipitations were performed overnight with specific antibodies (H2A.Z antibody from Abcam or gH2AX antibody from Millipore) or without antibody as negative control. Recovering of the immune

complexes was performed by the incubation of the samples with a mixture of blocked protein A/protein G beads on a rotating wheel (2 h at 4 °C). After washing, the DNA-protein cross-link was reversed by the addition of Rnase A to the samples and heating at 65 °C. After proteinase K digestion (2 h), DNA was purified and then quantified by qPCR using a Real-Time PCR machine (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's instructions. qPCR reactions were performed in triplicate.

#### Cell cycle analysis

Cells (U2OS and RG37) were transfected with siRNA (10 nM). Forty-eight hours later cells were harvested and fixed in ice-cold 70% ethanol. DNA was stained with propidium iodide (10  $\mu$ g/ml) in the presence of RNase (10  $\mu$ g/ml). Data were collected on a FACScalibur cytometer (Becton Dickinson) and analyzed using Modfit software (Verity Software).

#### Clonogenic assay

Cells were transfected with siRNA (10 nM), then 24 h later plated in triplicate at the density of 500 to 1000 cells per dish depending on the dose of ionizing radiations exposure. Dishes were irradiated 24 h later at 2, 4, or 6 Gy with a Cs<sup>137</sup> source (Biobeam 8000). To examine accurately the cloning efficiency additional experiments were performed in which 2000 cells were plated in dishes 24 h after transfection with the siRNA. The dishes were let in normal culture conditions during 10 d before staining of the colonies by crystal violet solution. Colonies of more than 50 cells were counted.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from EDF (Electricité de France) to YC and from the ARC (Association de Recherche contre le Cancer) to DT (Programme ARC). G-CT-T was supported by a fellowship from the Gabonian government and ANR (Projet blanc 2011 SVSE8 PinGs).

We acknowledge the Toulouse Genotoul TRI facilities (LBCMCP/FRBT) for flow cytometry and fluorescence microscopy. We are grateful to the Non-Invasive Exploration service - US006/CREFRE INSERM/UPS for giving access to the irradiator Biobeam 8000. We thank the Dr BS Lopez (IGR, Villejuif, France) for providing the GCS5 and GCV6 cell lines. We also thank Céline Reyes for her assistance with the living cells Laser irradiation experiments.

#### Supplemental Materials

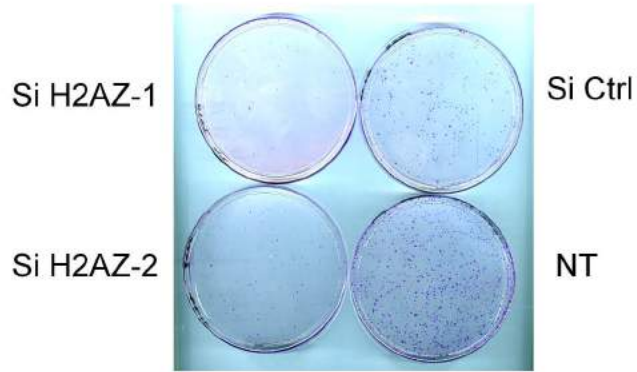
Supplemental materials may be found here: [www.landesbioscience.com/journals/cc/article/27143](http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/27143)

#### References

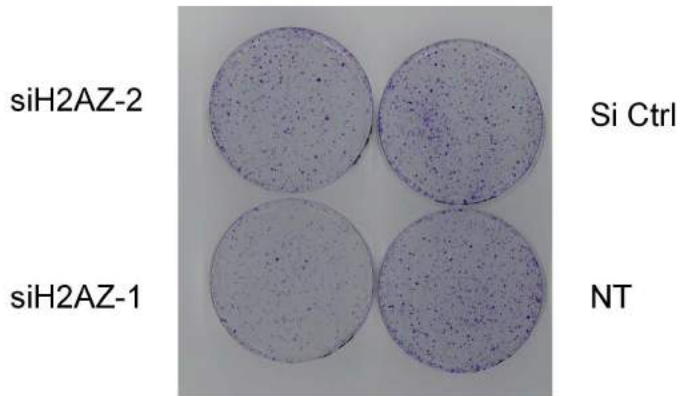
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411:366-74; PMID:11357144; <http://dx.doi.org/10.1038/35077232>
- Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:801-17; PMID:23175119; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3399>
- Hiom K. Coping with DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2010; 9:1256-63; PMID:21115283; <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.09.018>
- Grabarz A, Barascu A, Guirouilh-Barbat J, Lopez BS. Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res* 2012; 2:249-68; PMID:22679557
- Soria G, Polo SE, Almouzni G. Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol Cell* 2012; 46:722-34; PMID:22749398; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.002>
- Rossetto D, Truman AW, Kron SJ, Côté J. Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin Cancer Res* 2010; 16:4543-52; PMID:20823147; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0513>

7. Altmeyer M, Lukas J. To spread or not to spread-chromatin modifications in response to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23:156-65; PMID:23312207; <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2012.11.001>
8. Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 2009; 78:273-304; PMID:19355820; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>
9. Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 2003; 5:675-9; PMID:12792649; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1004>
10. Papamichos-Chronakis M, Watanabe S, Rando OJ, Peterson CL. Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell* 2011; 144:200-13; PMID:21241891; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.021>
11. Kalocsay M, Hiller NJ, Jentsch S. Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Mol Cell* 2009; 33:335-43; PMID:19217407; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.016>
12. Adkins NL, Niu H, Sung P, Peterson CL. Nucleosome dynamics regulates DNA processing. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20:836-42; PMID:23728291; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2585>
13. van Attikum H, Fritsch O, Gasser SM. Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks. *EMBO J* 2007; 26:4113-25; PMID:17762868; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601835>
14. Morillo-Huesca M, Clemente-Ruiz M, Andújar E, Prado F. The SWR1 histone replacement complex causes genetic instability and genome-wide transcription misregulation in the absence of H2A.Z. *PLoS One* 2010; 5:e12143; PMID:20711347; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012143>
15. Rosa M, Von Harder M, Cigliano RA, Schlögelhofer P, Mittelsten Scheid O. The Arabidopsis SWR1 chromatin-remodeling complex is important for DNA repair, somatic recombination, and meiosis. *Plant Cell* 2013; 25:1990-2001; PMID:23780875; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.104067>
16. Xu Y, Sun Y, Jiang X, Ayrapetov MK, Moskwa P, Yang S, Weinstock DM, Price BD. The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. *J Cell Biol* 2010; 191:31-43; PMID:20876283; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201001160>
17. Courilleau C, Chailleux C, Jauneau A, Grimal F, Briois S, Boutet-Robinet E, Boudsocq F, Trouche D, Canitrot Y. The chromatin remodeler p400 ATPase facilitates Rad51-mediated repair of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 2012; 199:1067-81; PMID:23266955; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201205059>
18. Xu Y, Ayrapetov MK, Xu C, Gursoy-Yuzugullu O, Hu Y, Price BD. Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 2012; 48:723-33; PMID:23122415; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.026>
19. Xie A, Kwok A, Scully R. Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16:814-8; PMID:19633669; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1640>
20. Zhao Y, Thomas HD, Batey MA, Cowell IG, Richardson CJ, Griffin RJ, Calvert AH, Newell DR, Smith GC, Curtin NJ. Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Res* 2006; 66:5354-62; PMID:16707462; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4275>
21. Gévry N, Chan HM, Laflamme L, Livingston DM, Gaudreau L. p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* 2007; 21:1869-81; PMID:17671089; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1545707>
22. Iacovoni JS, Caron P, Lassadi I, Nicolas E, Massip L, Trouche D, Legube G. High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J* 2010; 29:1446-57; PMID:20360682; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.38>
23. Dumay A, Lulier C, Bertrand P, Saintigny Y, Lebrun F, Vayssière JL, Lopez BS. Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene* 2006; 25:3196-205; PMID:16407825; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209344>
24. Mattera L, Courilleau C, Legube G, Ueda T, Fukunaga R, Chevillard-Briet M, Canitrot Y, Escaffit F, Trouche D. The E1A-associated p400 protein modulates cell fate decisions by the regulation of ROS homeostasis. *PLoS Genet* 2010; 6:e1000983; PMID:20548951; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000983>

## U2OS

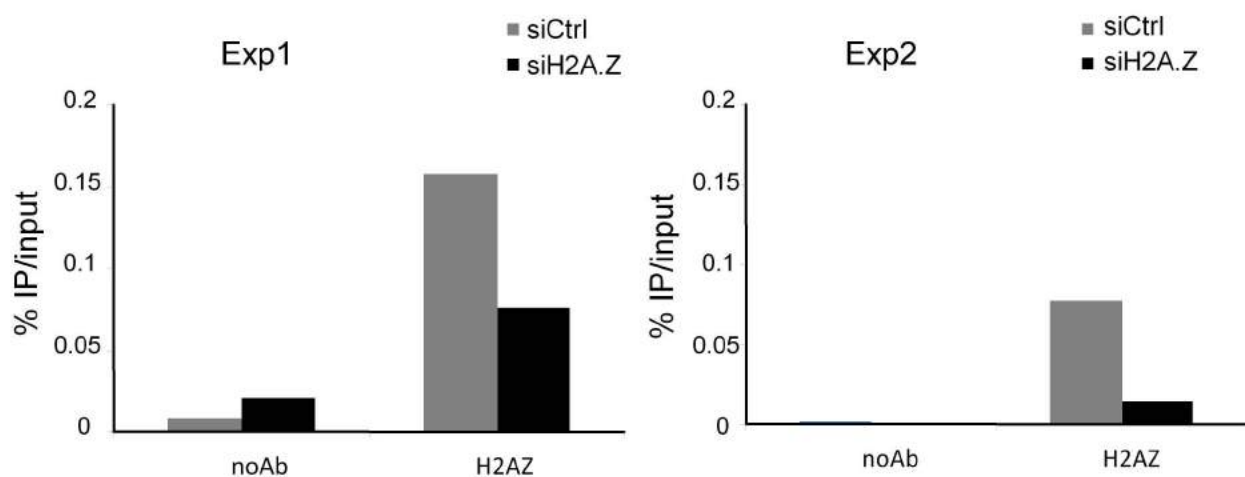


## RG37



Supplemental Figure1.

Photographs of the plates stained with crystal violet solution and revealing the presence of clones in siRNAs transfected cells 10 days post transfection.



Supplemental data figure 2. ChIP experiment showing H2A.Z accumulation at AsiSI\_site1. Each histogram represent one totally independent experiment. Bars are the mean of PCR triplicate



## **II-B-Article 2: Control of alternative end joining by the chromatin remodeler p400 ATPase**

Taty-Taty Gemaël-Cedrick, Chailleux Catherine, Quaranta Muriel, So A-Yeong, Guirouilh-Barbat Josée, Lopez Bernard S, Bertrand Pascale, Trouche Didier and Canitrot Yvan

Nucleic. Acids Res. (29 February 2016) 44 (4): 1657-1668 first published online November 17, 2015doi:10.1093/nar/gkv1202

### **B-1-Introduction**

Lorsque j'ai commencé ma thèse il était connu chez la drosophile, la levure et l'homme que p400 était capable d'échanger (ou participait à l'échange de) l'histone canonique H2A par son variant H2A.Z dans le nucléosome (Kusch et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004; Xu et al., 2012). Chez *Drosophila melanogaster*, il a été montré dans la lignée cellulaire S2 que domino (Kusch et al., 2004), l'homologue de p400 chez cette espèce, est capable d'incorporer H2Av, l'homologue à la fois des variants H2A.Z et H2AX, dans le nucléosome. Au cours de ces travaux, les auteurs montrent que chez la drosophile, le complexe dTip60 contenant domino (homologue du complexe Tip60 chez l'homme) acétyle phospho-H2Av (la forme phosphorylée du variant H2Av qui représente à la fois H2AX et H2A.Z) via son activité histone acétyltransférase, puis, catalyse l'échange de cette forme phosphorylée (phospho-H2Av) par une forme non phosphorylée (H2Av) via l'activité de remodelage de la chromatine ATP-dépendant de domino. Chez la levure, SWR1 (Mizuguchi et al., 2004), l'homologue de p400, catalyse la réaction qui échange le dimère H2A/H2B par le dimère H2A.Z/H2B. (Htz1 est l'homologue du variant H2A.Z chez la levure). Chez les mammifères, ce rôle de p400 (Park et al., 2010) dans le dépôt du variant H2A.Z au niveau du nucléosome, est conservé. Toutefois, une étude a récemment montré que p400 contrôle le dépôt du variant H3.3 de l'histone H3, dans le nucléosome au cours de la transcription, en remplaçant le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> par un autre tétramère contenant H3.3 (Pradhan et al., 2016).

Par ailleurs, en plus du remodelage de la chromatine via le dépôt du variant H2A.Z dans le nucléosome en réponse aux dommages à l'ADN, quelques données sont disponibles à ce jour en ce qui concerne l'implication de p400 dans la réparation des DSB. Une étude réalisée en 2010 dans l'équipe de Brendan D. Price, montre que p400 joue un rôle essentiel dans le recrutement de facteurs importants de la réparation des DSB, parmi lesquels 53BP1 et BRCA1. Cette étude révèle un rôle important de p400 dans le contrôle des mécanismes de réparation des DSB (Xu et al., 2010) et montrent que p400 relâche la structure chromatinienn

en réponse aux DSB ce qui permettrait un accès aux dommages aux différentes machineries de réparation. Par ailleurs, une étude précédente de notre équipe montre que p400 influence directement la réparation des DSB par RH en interagissant directement avec RAD51 (Courilleau et al., 2012). Dans ce contexte, l'objectif de la dernière partie de ma thèse a été de découvrir si et comment p400 influençait les autres mécanismes de réparation des DSB comme le NHEJ, et si p400 intervenait dans le contrôle de la stabilité du génome en réponse aux agents endommageant l'ADN.

## **B-2-Résultats expérimentaux**

J'ai d'abord analysé dans des fibroblastes humains immortalisés, l'implication de p400 dans le contrôle de la stabilité du génome. A l'aide du test HPRT (Figure 21 dans la partie matériel et méthodes) (Huk et al., 2015) et par l'utilisation d'analyses caryotypiques j'ai observé que la déplétion de p400 induit de l'instabilité génétique en réponse aux dommages à l'ADN.

Pour savoir si cette instabilité génétique était le résultat d'un défaut de réparation des DSB par NHEJ, j'ai utilisé des lignées cellulaires dans lesquelles différents substrats rapporteurs de l'activité de réparation des DSB avaient été insérés. En utilisant ces lignées cellulaires j'ai mis en évidence que la déplétion de p400 provoquait une réparation des DSB par le mécanisme dit "NHEJ alternatif" qui génère des délétions au niveau des sites de réparation.

Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) m'ont permis de révéler que la perte de fonction de p400 conduit à un recrutement de PARP1 et de l'ADN ligase 3 à la DSB (deux acteurs de la voie de NHEJ alternatif). Ces résultats montrent que la présence de p400 empêche le recrutement des facteurs de la voie du NHEJ alternatif et que p400 réprime l'usage de cette voie.

D'après ces résultats, notre hypothèse est que l'induction du NHEJ alternatif, observée lors de l'inhibition de p400 pourrait être une conséquence du défaut de réparation des DSB par RH (voir le modèle dans la publication figure 7D).

En raison de l'observation d'un recrutement accru de PARP dans les cellules déplétées pour p400 nous avons utilisé des inhibiteurs de PARP afin d'essayer de tuer sélectivement ces cellules sujettes à de l'instabilité génétique. Des expériences de survie cellulaire montrent une sensibilité accrue des cellules déplétées en p400. Ce résultat révèle un mécanisme de cytotoxicité spécifique pour les cellules déficientes en p400.

## **Conclusion**

La dernière partie de mes travaux de thèse a permis de montrer que p400 est impliquée dans le contrôle de la stabilité génomique via l'inhibition de la voie de réparation des DSBs par NHEJ alternatif. Dans les cellules déplétées en p400, il y a un défaut de réparation par RH consécutif à un défaut de chargement de RAD51 sur le simple brin. Le processus de résection étant déjà engagé, si cette résection est courte la réparation de la DSB peut se faire par NHEJ classique. Mais, s'il s'agit d'une longue résection, la réparation se fera par le mécanisme du NHEJ alternatif, qui génère une instabilité génomique et une sensibilité accrue aux inhibiteurs de PARP.

# Control of alternative end joining by the chromatin remodeler p400 ATPase

Gemael-Cedrick Taty-Taty<sup>1,2</sup>, Catherine Chailleux<sup>1,2</sup>, Muriel Quaranta<sup>1,2</sup>, Ayeong So<sup>3</sup>, Josée Guirouilh-Barbat<sup>3</sup>, Bernard S. Lopez<sup>3</sup>, Pascale Bertrand<sup>4</sup>, Didier Trouche<sup>1,2</sup> and Yvan Canitrot<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Toulouse, UPS, LBCMCP, F-31062 Toulouse, France, <sup>2</sup>CNRS UMR5088, LBCMCP, F-31062 Toulouse, France, <sup>3</sup>Université Paris Sud, CNRS UMR8200, IGR, Villejuif, France and <sup>4</sup>CEA DSV, UMR 967 CEA-INSERM-Université Paris Diderot-Université Paris Sud, Fontenay aux roses, France

Received April 22, 2015; Revised October 26, 2015; Accepted October 26, 2015

## ABSTRACT

**Repair of DNA double-strand breaks occurs in a chromatin context that needs to be modified and remodeled to allow suitable access to the different DNA repair machineries. Of particular importance for the maintenance of genetic stability is the tight control of error-prone pathways, such as the alternative End Joining pathway. Here, we show that the chromatin remodeler p400 ATPase is a brake to the use of alternative End Joining. Using specific intracellular reporter substrates we observed that p400 depletion increases the frequency of alternative End Joining events, and generates large deletions following repair of double-strand breaks. This increase of alternative End Joining events is largely dependent on CtIP-mediated resection, indicating that it is probably related to the role of p400 in late steps of homologous recombination. Moreover, p400 depletion leads to the recruitment of poly(ADP) ribose polymerase (PARP) and DNA ligase 3 at DNA double-strand breaks, driving to selective killing by PARP inhibitors. All together these results show that p400 acts as a brake to prevent alternative End Joining-dependent genetic instability and underline its potential value as a clinical marker.**

## INTRODUCTION

DNA double strand breaks (DSB) are DNA damages with different origins that need to be repaired to avoid cell death. In addition, their repair must be faithful to prevent genetic instability such as chromosome rearrangements. The repair of DSB is performed by two major pathways: homologous recombination (HR), which is cell cycle dependent as it uses the information present on sister chromatid, and non-homologous end-joining (NHEJ). In mammalian cells,

NHEJ is the main pathway involved in DSB repair since it functions throughout all cell cycle phases (1,2). HR begins by the generation of single strand DNA through DNA resection mediated by the exonuclease activity of Mre11 but also CtIP, Exo1 or Dna2 (3). In S and G2 cells, the two pathways co-exist, and the extent of DNA resection is an important parameter dictating the use of one or the other pathway. When resection is important, DSBs can no longer be repaired by classical NHEJ and have to be repaired by HR. NHEJ involves direct sealing of the DNA ends made of the sequential events of Ku binding to DNA ends followed by DNA-PKcs recruitment and final ligation performed by the ligase IV–XRCC4 complex (4). However, when classical NHEJ is defective, DSB are repaired unfaithfully with the generation of large deletion at the site of repair (5). This repair activity was named alternative NHEJ (AltEJ). As an error-prone mechanism, AltEJ has been proposed to be involved in the chromosomal rearrangements observed in some leukemia (6), although some recent findings suggest that classical NHEJ could also be involved (7). Despite its importance for genetic instability, the factors involved in the AltEJ process are still under debate and the control of its activity is largely unknown.

More and more evidence indicate that DNA repair is facilitated or inhibited depending on the chromatin context (8,9). DNA is wrapped onto histone proteins to form nucleosomes and this structure can be modified by changing the composition of the nucleosome (introduction of histone variant) and/or by the post translational modifications of histones such as acetylation and methylation. Modulation of DNA repair activity has been shown to be associated or influenced by changes in chromatin marks (10) or by the activity of chromatin remodelers such as INO80 (11), CHD4 (12) or ACF1 (13). Recent data have shown the importance of the p400 ATPase, an enzyme conserved from yeast to human and which can mediate the incorporation of the histone variant H2A.Z in chromatin. p400 belongs to a multimolecular complex also containing the histone acetyl transferase

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 5 61 55 81 84; Fax: +33 5 61 55 65 07; Email: yvan.canitrot@univ-tlse3.fr

Tip60. We showed that the p400 ATPase promotes HR by binding directly the Rad51 recombinase (14). Other studies indicate that it also affects NHEJ by controlling Ku recruitment to DSB via the incorporation of the histone variant H2A.Z (15). However, the role of H2A.Z in DSB repair in mammals is still a matter of debate, and as a consequence, the exact role of p400 is unclear (16,17). Here, we examined DSB repair activity in p400 depleted cells. We observed that p400 promotes genetic stability by preventing the use of Alt-EJ.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture and transfections

The GC92 and GCSH14 cell lines have been derived from SV40 T-transformed GM639 human fibroblasts. The U2OS-EJ2 cell line has been derived from the osteosarcoma cell line U2OS (18). All cell lines were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with antibiotics, 10% FCS (all from Invitrogen). The AsiSI-ER-U2OS stable cell line (19) was cultured in DMEM medium supplemented with 10% FCS and antibiotics. When needed, 300 nM of 4OH-tamoxifen was added to culture medium for 4 h.

For siRNA transfection,  $1 \times 10^5$  cells were transfected with siRNA (10 nM) using Interferin (Ozyme, France) according to the manufacturer's instructions, or  $5 \times 10^6$  cells were electroporated with siRNAs (10  $\mu$ M) using an electroporation device (Amaxa AG, Koln, Germany), according to manufacturer's specifications (for all other experiments). Plasmids were transfected with Jet-PEI (Ozyme, France) according to the manufacturer's indications.

### Western blot

Total cell lysates were prepared by the resuspension of the cells directly in Laemmli buffer and sonication. Cells extracts were separated on 4–12% gradient SDS-PAGE. Proteins were transferred on nitrocellulose membrane. Primary antibodies as well as peroxidase-conjugated secondary antibodies were used according to standard western blot procedure and peroxidase activity was detected by using the Lumi-LightPLUS Western Blotting Substrate (Roche Diagnostics, Meylan, France). The antibodies used were anti p400 from Abcam,  $\alpha$ -tubulin from Sigma-Aldrich, anti myc from Roche (9E10).

### NHEJ assay

GCSH14 cells were transfected with siRNA (10 nM) using Interferin (Ozyme) according to the manufacturer's instructions. After 24 h, cells were transfected with I-SceI coding plasmid using JetPei (Ozyme) according to the manufacturer's instructions. After 72 h, cells were trypsinized and analyzed by flow cytometry (BD FacsCalibur) to detect GFP expressing cells. Percentage of GFP positive cells was calculated after analysis on 25 000 sorted events. Measurement of NHEJ events using the GC92 cell line were performed as previously described (20,21). Cells were transfected with the different siRNA and I-SceI plasmid as described for GCSH14 cell line. The presence of CD4 events was detected

using antibody coupled to alexa488 directed against CD4 (Biolegend). CD4 positive cells were quantified by flow cytometry on 25 000 sorted events.

### Junction sequence analysis

Genomic DNA from GC92 cells treated with the different siRNAs and transfected with I-SceI expression plasmid was prepared using DNA easy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. PCR were performed on the different genomic DNA using primers CMV1 (5'-TGGCCCGCCTGGCATTATGCC-3') and CD4int (5'-GCTGCCCCAGAATCTTCTCT-3'). PCR products were cloned into pGEM-T (Promega) and individual clones sequenced (Eurofins, Ebersberg, Germany).

### Measurement of resection at DSB

U2OS-ASiSI cells (DSB Inducible via AsiSI) (19) were transfected with siRNA using the Cell Line Nucleofactor kit V (Amaxa) according to the manufacturer's instructions. After 48 h, siRNA transfection, cells were treated or not with 300 nM of 4-hydroxytamoxifen (4OHT) (Sigma; H7904) for 4 h. DNA was purified using QIAGEN DNeasy kit. The level of resection generated at an AsiSI-induced DSB was measured by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). After RNaseH treatment (20 units), genomic DNA sample was digested or not with 20 units of restriction enzymes (BamI) at 37°C overnight. Two microliters of digested or not samples (20 ng) were used as templates in 25  $\mu$ l of qPCR reaction containing 12.5  $\mu$ l TAKARA Mix PCR. The percentage of ssDNA (ssDNA%) generated by resection at selected sites was determined as previously described (22). Briefly, for each sample, a  $\Delta$ Ct was calculated by subtracting the Ct value of the not digested sample from the Ct value of the digested sample. The ssDNA% was calculated with the following equation:  $ssDNA\% = 1/(2^{\Delta Ct-1} + 0.5) \times 100$ .

### Chromatin immunoprecipitation experiments

Cells were crosslinked with formaldehyde (1%, 20 min) and ChIPs were performed as described (23) using 200  $\mu$ g of chromatin. Briefly, nuclei were prepared and sonicated to obtain DNA fragments of ~500–1000 bp. Following preclearing and blocking steps, samples were incubated overnight at 4°C with specific antibodies or without antibody as negative control. Immune complexes were then recovered by incubating the samples with blocked protein A/protein G beads for 2 h at 4°C on a rotating wheel. After extensive washing, crosslink was reversed by adding RNase A to the samples and incubating overnight at 65°C. After a 1h30 proteinase K treatment, DNA was purified with the GFX PCR kit (Amersham), and analyzed by Q-PCR.

### Real time PCR analysis

Q-PCR analysis was performed on a CFX96 Real-time system device (BioRad) using the IQ SYBR Supermix (BioRad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), according to the manufacturer's instructions. All samples were analyzed in triplicates.



### HPRT mutagenesis assay

Cells were transfected with the different siRNA then 48 h later irradiated. For determination of IR-induced mutagenesis, cells were irradiated (4 Gy) with a Cs<sup>137</sup> source (Biobeam 8000), and let grow for 4 days. Then replica cultures were plated at the density of 10<sup>6</sup> cells per plate and exposed to 20 μM of 6-thioguanine-containing media in order to determine the number of HPRT mutants. After 10 days, colonies were stained with crystal violet and counted. Mutation frequencies were calculated by correcting for plating efficiency and IR survival and expressed as mutation frequency per million of living cells.

### Clonogenic assay

Cells were transfected with the different siRNA and 48 h later plated at 500 cells/plate. Forty eight hours after siRNA transfection, cells were incubated with the PARP inhibitor (olaparib) at the indicated concentration and irradiated when mentioned. After 10 days, colonies were stained with crystal violet and counted. Colonies of more than 50 cells were scored.

### Karyotype analysis

Cells were transfected with the different siRNAs and 48 h later irradiated with 2 Gy when indicated. Twenty four hours after irradiation, cells were incubated in medium with colcemid (0.1 μg/ml) during 3 h. Cells were harvested, incubated in hypotonic buffer (75 mM KCl), and fixed with ethanol/acetic acid (3:1). Metaphase spreads were stained with DAPI. Chromosomal aberrations were analyzed using Leica microscope (DM5000) (objective 100×).

### Statistical analysis

Experimental differences were tested for significance using Student's *t*-test (two sided) for two samples with paired samples. Unless indicated otherwise, results are the mean with error bars showing the standard deviation. In some cases (chromosomal aberrations analyses) significance for differences between two experimental conditions were tested using Wilcoxon test (two-sided) and results are the mean with standard error.

## RESULTS

### NHEJ events are increased after p400 depletion

To investigate the role of p400 in NHEJ, we used reporter systems for NHEJ relying on artificial substrates integrated in the genomic DNA, allowing the expression of a reporter gene following NHEJ-mediated repair of DSB induced by the I-SceI endonuclease. We first used the GC92 cell line which is derived from immortalized human fibroblasts and contains as a single copy a substrate composed of three genes H2-Kd, CD4 and CD8, the only expressed gene being H2-Kd (Figure 1A). Two I-SceI sites present in non-coding sequences are separated by 3.2 kb of DNA. After expression of and cleavage by the I-SceI enzyme, the H2-Kd/CD8 fragment is removed and the rejoining of DNA ends by NHEJ

events leads to the expression of the CD4 gene (20,21). We observed that p400 depletion using two different siRNAs induces an increase in the frequency of CD4 positive cells monitoring NHEJ events, indicating that p400 represses NHEJ events (Figure 1B). Importantly, restoration of p400 expression using an expression vector coding for siRNA-resistant p400 restored normal level of NHEJ events (Supplemental Figure S1), demonstrating that the effects of p400 siRNA are specifically mediated by p400 depletion. Strikingly, when we used another cell line (GCSH14) with identical genetic background but harboring a different substrate designed to evaluate NHEJ activity (Figure 1C), we did not observe any increase of NHEJ events upon p400 depletion instead it induces a slight decrease in the efficiency of the repair (Figure 1D). The reason for this decrease is unclear, and probably related to changes in the local chromatin structure induced by p400 depletion.

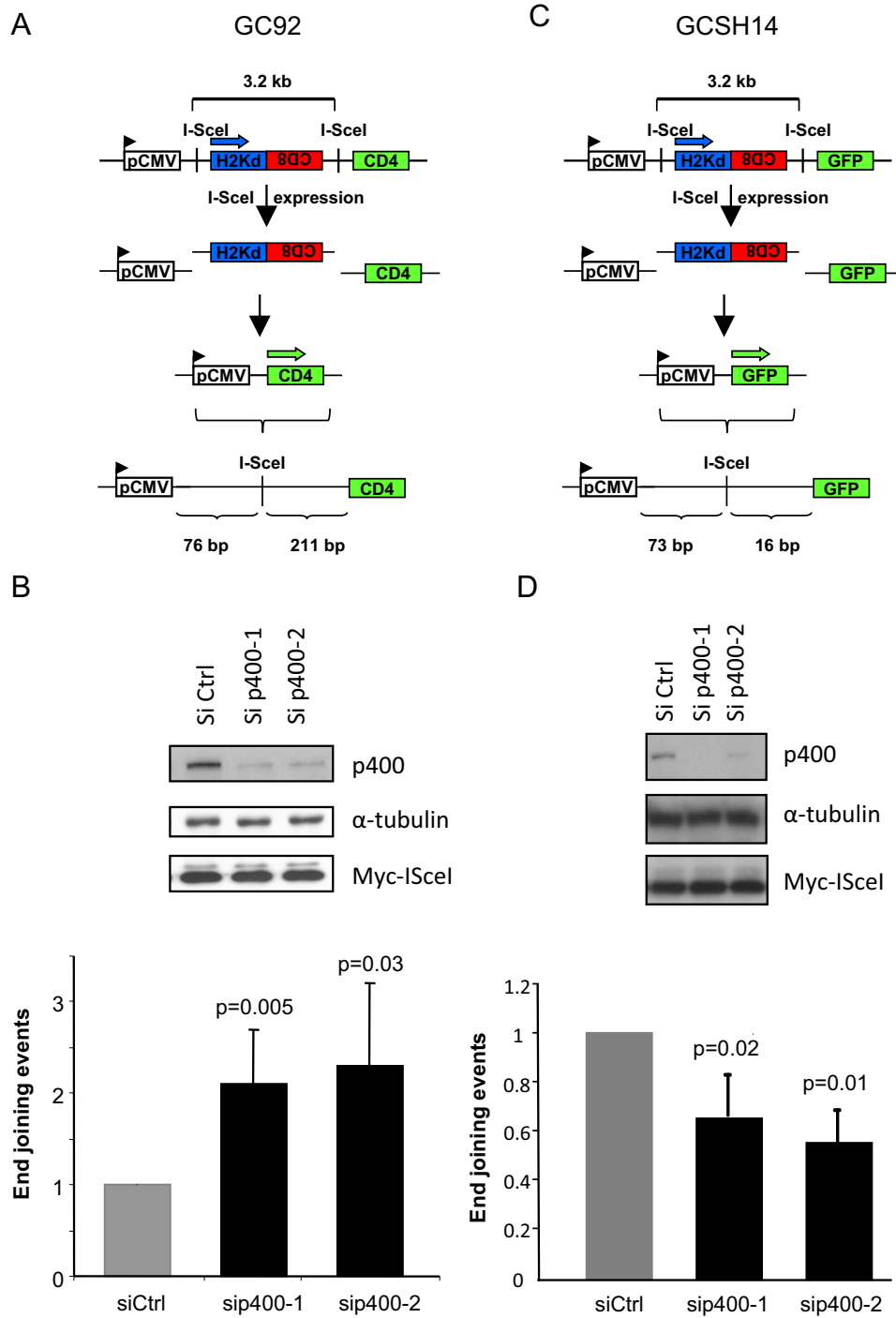
Data from Figure 1 indicates that p400 specifically affects a step of end joining which is not observable with the latter substrate. The main difference between this latter substrate and the one present in GC92 cells is the distance between the repaired break and the important features for the expression of the reporter protein (the initiation codon for GFP) that is shorter in GCSH14 cell lines (Figure 1C) than in GC92 cells (Figure 1A). We reasoned that the differences observed in p400 dependency between these cell lines could result from large deletions around the breaks upon p400 depletion that would not be detected in GCSH14 cell lines as they would remove the GFP start codon located 16 bp from the I-SceI site. Such an explanation would also be consistent with our previous results showing that p400 depletion does not affect EJ events measured using another substrate harboring similar features than the GCSH14 cells (14).

### P400 depletion leads to large deletions around DSB

To confirm our assumption that the differences observed between the GC92 and GCSH14 result from large deletions around the repaired DNA breaks we collected the NHEJ induced junctions containing CD4 events generated in the GC92 cells, and sequenced them. We found that p400 depletion strongly increases the proportion of deletion events (Figure 2). Moreover, these deletions are larger than the ones observed in control cells (Figure 2 histogram). Such large deletions would not have been detected using the reporter substrate present in GCSH14 cell lines because the GFP start codon would have been deleted. Thus, the presence of larger deletions probably explains the difference observed after p400 depletion on NHEJ efficiency measured using the various reporter substrates. These data show that p400 prevents the occurrence of deletions at DSBs. They also show that the choice of the substrate to measure NHEJ activity can alter the meaning of the results obtained in such experiments based on reporter systems.

### P400 controls alternative EJ events and prevents genetic instability

Next, we investigated the involvement of AltEJ pathway, which is a highly mutagenic pathway known to produce a high frequency of such deletion events (20,21). To examine

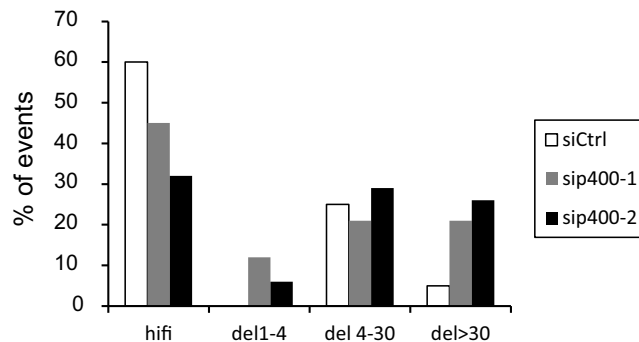


**Figure 1.** Effects of p400 depletion on NHEJ events. (A) Schematic representation of the NHEJ substrate present in GC92 cell line. (B) Frequency of NHEJ events in GC92 cells. For sip400-1,  $n = 5$ , for sip400-2,  $n = 4$ . Results are presented as the mean  $\pm$  SD of independent experiments. (C) Schematic representation of the NHEJ substrate present in GCSH14 cell line. (D) Frequency of NHEJ events in GCSH14 cells. Results are the mean  $\pm$  SD of five independent experiments.

**Sip400-1**  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT (x15)  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTT--CCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCT--TATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTA---CCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT (x2)  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTA-----TCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTAT-----TGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCT-----ATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT (x4)  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACAC-----del 23-----TATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGC-----del 28-----TATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACG-----del 45-----CCATGTAGTGT  
AAAATGTCGTAAACA-----del 181-----CCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
-----del 222-----TATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
TGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGA-----del 251-----GAGCCATCTCTTAGGCGCTGTGTGC (x2)  
CTCCACCCATTGAGC-----del 304-----AACCCGGTCACCCATTGAAATTCGAGCTC  
CATCTAGTATTAGTATCGCTATTACCATGGT-----del 752-----AGAGGAAGATTCTGGGGCAGCA

**Sip400-2**  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTGCTCTAGATAGGTTGCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT (x11)  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCT--TTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTT--CCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACC-----TCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTA-----TCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCT-----ATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT (x4)  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGT-----GAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGG-----del 21-----TAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGA-----del 27-----TATGAAATCAGCCATGTAGTGT (x2)  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAG-----del 37-----AGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTC-----del 40-----GATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTA-----del 42-----TCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCAA-----del 74-----TGTA  
-----del 116-----CTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAA-----del 267-----  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACG-----del 401-----  
CGGCCGGAGCATGC-----del 470-----GAGCTCGGGCCC  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC-----del 453-----

**Si Ctrl**  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATAGAGGCAGA-ins195-GCTGACCCCTATCTAGAT (x2)  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTGTTATCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCT-----ATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT (x4)  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTA-----TCCCTATCTAGATATGAAATCAGCCATGTAGTGT  
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCCTG-----del 283-----



**Figure 2.** Sequences of the End-Joining repaired junctions. GC92 cells were transfected with Ctrl or p400 siRNAs then transfected with I-SceI to induce DSB. Seventy two hours after I-SceI transfection, genomic DNA was prepared and repaired junctions sequenced. Histogram showing the distribution of the repair events; HiFi: high fidelity, del 1–4 are deletions from the four protruding nucleotide generated by I-SceI cutting (green sequence). Sequences in black are insertions. Sequences in red are sequences outside the normal sequence in blue.



the role of p400 in the control of AltEJ we used a cell line specifically designed to measure AltEJ events and derived from U2OS osteosarcoma cells (18). The substrate present in this cell line evaluates the use of microhomology (8 bp) to repair DSB as proposed for the AltEJ pathway (Figure 3A). Depletion of p400 with either of the two siRNAs increases the frequency of AltEJ events (Figure 3B), indicating that p400 represses AltEJ pathway and confirming that the occurrence of large deletions upon p400 inhibition probably results from the use of AltEJ pathways. We also tested the effect of p400 depletion on the use of single strand annealing (SSA), which is another backup repair mechanism. By using a U2OS cell line containing a substrate designed to monitor SSA events (18) we did not observe any increase in SSA efficiency upon p400 depletion, indicating that p400 does not repress the SSA process (Supplemental Figure S2).

As AltEJ is a highly mutagenic pathway, we measured the influence of p400 on genetic instability using the HPRT forward mutagenesis assay (24). Mutations or deletions that inactivate the HPRT gene involved in the purine-salvage pathway, induce cell survival upon exposure to the purine analogue 6-thioguanine. The number of clones obtained in the presence of 6-thioguanine reflects the mutation rate on the endogenous HPRT gene. We observed that p400 depletion *per se* induces a 2-fold increase in the spontaneous mutagenesis frequency (Figure 3C). In response to IR exposure (4 Gy), mutagenesis frequency increases, as expected and is even more stimulated in p400-depleted cells. In addition, chromosomal aberrations such as dicentric chromosomes and chromatid breaks were scored and significantly increased in p400 depleted cells either untreated or after IR exposure (Figure 3D and E). Similar results were obtained in mouse embryonic fibroblasts from transgenic mice made defective for p400 (Supplemental Figure S3). These data indicate that p400 expression is important to maintain genetic stability both in basal conditions and in response to DNA damage, suggesting that the increased AltEJ activity in p400 depleted cells translates into genetic instability.

#### **P400 depletion leads to the recruitment of AltEJ factors to DSB**

We next investigated consequences of p400 depletion on the recruitment of AltEJ factors to DNA double strand breaks. We previously established a cell line in which DSBs are induced by the relocalisation of the AsiSI endonuclease to the nucleus after addition of 4-hydroxy-tamoxifen (OHT) to the medium (19). Using this cell line we did not observe any specific enrichment of sequences near DSBs when PARP or DNA ligase3, two factors of AltEJ repair, (25–27) are immunoprecipitated from control cells (Figure 4A and B). However, in p400-depleted cells, immunoprecipitation of PARP and DNA ligase 3 leads to the co-immunoprecipitation of DNA sequences located close to three AsiSI-mediated DSBs. Such enrichment is not observed in absence of DSB (-OHT) nor for genomic sequences located far from any break (P0), indicating that it reflects binding of DNA ligase 3 and PARP to DSBs (Figure 4A and B). To our knowledge, these data are the first demonstration of recruitment of AltEJ factors close to DSB. In addition, they show that such recruitment can

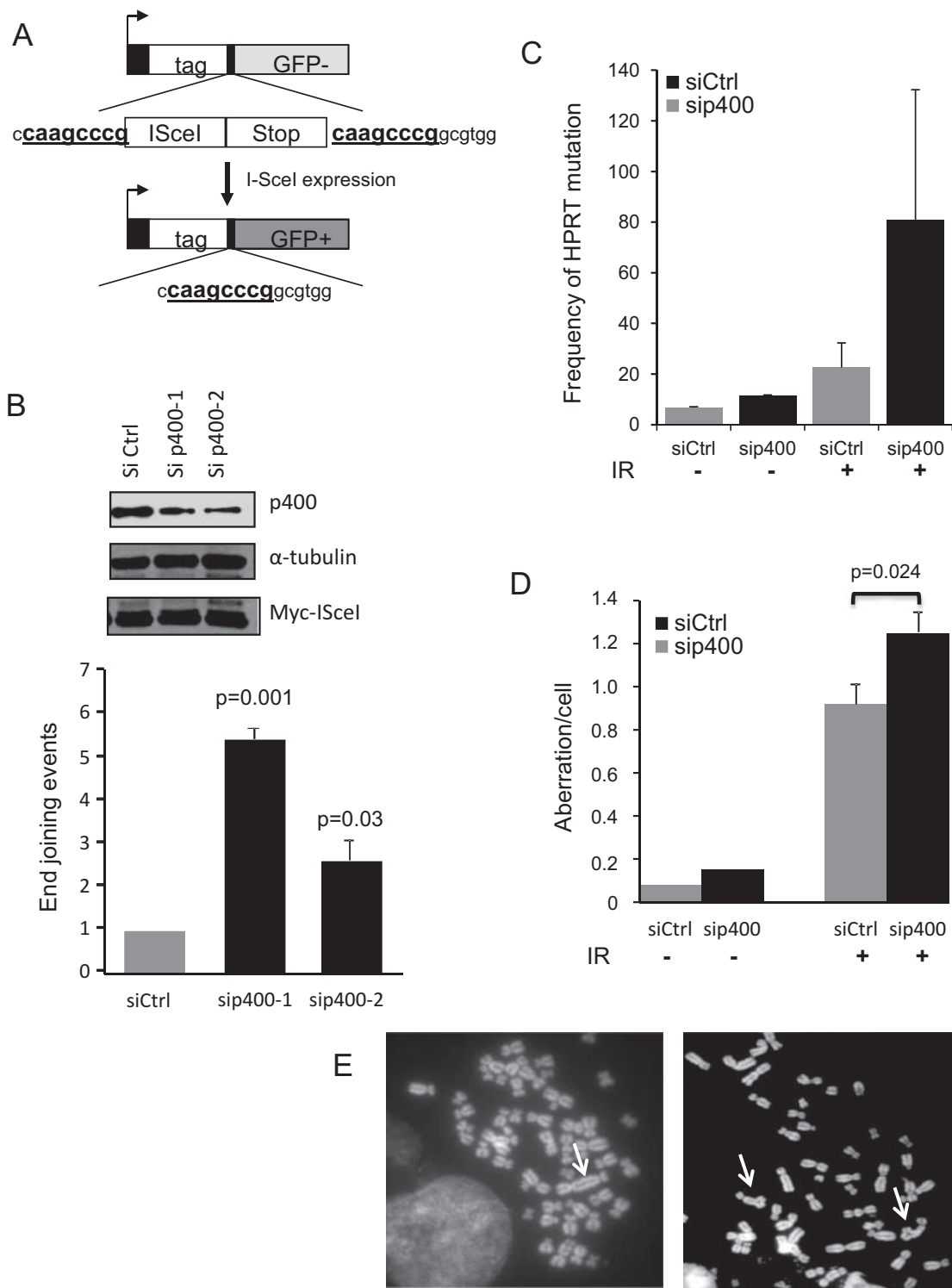
be detected only upon p400 depletion, demonstrating that p400 inhibits the recruitment of AltEJ factors to DSBs. Importantly, site 1 is classified as HR prone whereas site 2 has been shown as NHEJ prone by Aymard et al. (9). We confirmed the difference in the Rad51/XRCC4 ratio (Supplemental Figure S4) between these two sites. We found that the recruitment of AltEJ factors was comparable on these two sites upon p400 depletion, although it was slightly lower for the HR prone DSB (Figure 4A and B).

#### **AltEJ activation upon p400 depletion is due to the inhibition of late steps of homologous recombination**

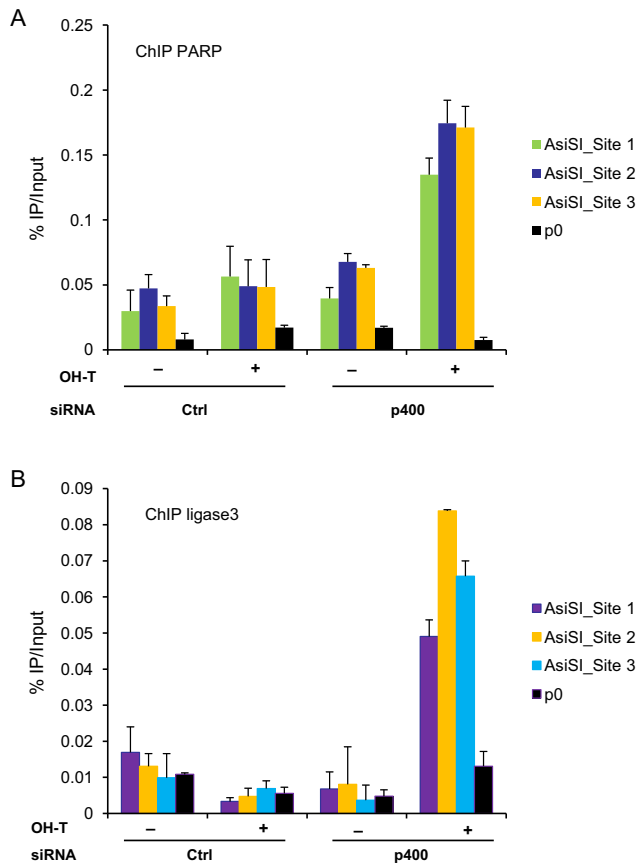
We next investigated the mechanism by which p400 depletion leads to the appearance of AltEJ events. To gain insights into such mechanism, we first investigated the influence of p400 depletion on recruitment of HR and classical NHEJ factors. By Chromatin immunoprecipitation, we confirmed our previous findings that p400 depletion decreases the recruitment of Rad51 to DSB (Figure 5A). Strikingly, recruitment of a NHEJ factor, XRCC4 is not decreased upon p400 depletion. Actually, XRCC4 recruitment is increased, either because U2OS cells accumulate in G1 following p400 depletion (23), or because a subset of these breaks experience only minor resection and are redirected to classical NHEJ in the absence of p400. This result indicates that the increased recruitment of AltEJ factors correlates with a decreased recruitment of Rad51 upon p400 depletion, suggesting that some breaks normally repaired by HR are redirected to AltEJ in the absence of p400.

Interestingly, we previously showed that p400 depletion leads to defects in HR but does not alter RPA recruitment after DNA damage in U2OS and 293T cells, a finding that we confirmed here (Supplemental Figure S5) (14). We thus reasoned that the increased AltEJ activity upon p400 depletion could be the consequence of defective HR downstream of the DNA resection step. Indeed, such defects could result in the presence of large bunches of single strand DNA that cannot be repaired by classical NHEJ (which is impossible when resection is too important) nor by HR (since it is inhibited). To test this possibility, we first directly measured DNA resection efficiency upon p400 depletion. We used an assay recently developed for monitoring the presence of single strand DNA around DSB induced by sequence-specific endonuclease (22). We found that p400 depletion does not decrease the percentage of breaks harboring resection, neither the extent of resection (Figure 5B). Although it was not possible to examine DNA resection on the AsiSI sites analyzed in ChIP experiment (because of unavailability of convenient restriction enzyme sites), these results indicate that the increase in AltEJ activity is not associated with a decrease in resection.

We next tested the relationship between resection and AltEJ induction after p400 depletion. For that purpose, resection was inhibited using CtIP siRNAs (22), and we analyzed AltEJ events with the relevant reporter substrate (used in Figure 3A). We found that depleting p400, as already shown, stimulated AltEJ, whereas depleting CtIP has no effect, indicating that resection is not required for basal AltEJ (Figure 6A). However, codepletion of both largely abolishes the generation of AltEJ events caused by p400 de-



**Figure 3.** p400 depletion increases alternative End-Joining events and induces genetic instability. (A) Schematic representation of the alt-NHEJ substrate presents in U2OS cells. (B) Frequency of alt-NHEJ events in p400 depleted cells. Results are the mean  $\pm$  SD of four independent experiments. (C) Mutagenesis at the HPRT locus in response to DNA damage in p400 depleted cells. HPRT mutagenesis in GC92 cells depleted for p400 compared with siCtrl treated cells. Transfected cells were left unirradiated or exposed to IR (4 Gy). Results are expressed as frequency of mutation per million living cells. Results are the mean and SEM of two totally independent experiments. (D) Transfected cells were unirradiated or irradiated (2 Gy) and 24 h later metaphase spreads prepared and chromosome aberrations per cell scored ( $n = 60$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  standard error. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test. (E) Examples of chromosomal aberrations observed on metaphase spreads, left panel arrow indicates dicentric chromosome, right panel arrows indicate triradial structures.

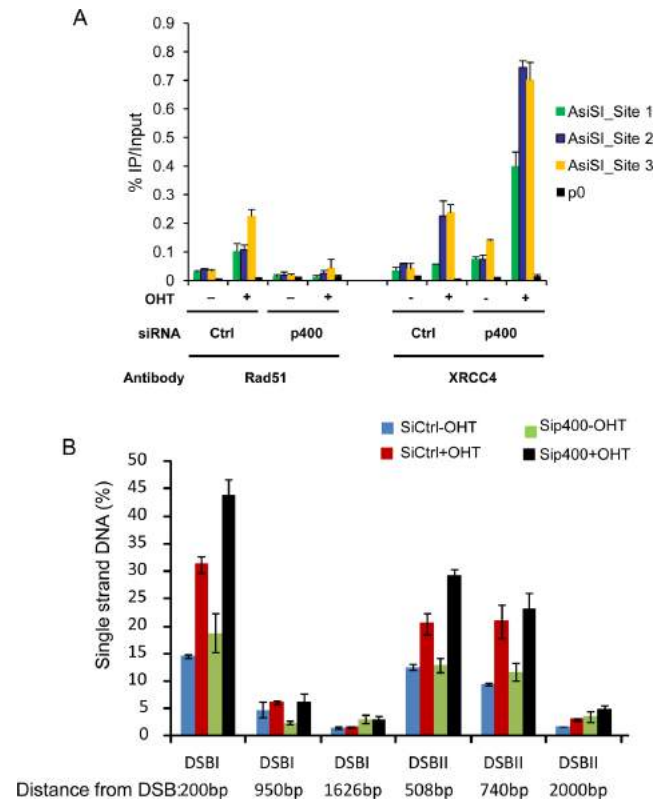


**Figure 4.** Influence of p400 on the recruitment of AltEJ factors at DSB. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiment was performed on U2OS-AsiSI cells. DSB were induced by OHTam addition and ChIP experiment performed with PARP1 or DNA ligase3 antibodies. For each condition, three different DSBs were examined together with the P0 as control. One representative experiment from three totally independent experiments is shown. Mean and standard deviation have been calculated on the PCR values. (A) Recruitment of PARP. (B) Recruitment of DNA ligase 3.

pletion, indicating that the AltEJ events are dependent on CtIP-mediated resection around DSB. Similar results were obtained in GC92 cells, the cell line we used in Figure 1A allowing measurement of both NHEJ and AltEJ events showing that a significant part of AltEJ events induced following p400 depletion was decreased after co depletion of CtIP (Figure 6B). These data indicate that AltEJ events induced by p400 depletion are dependent on the presence of resected DNA ends.

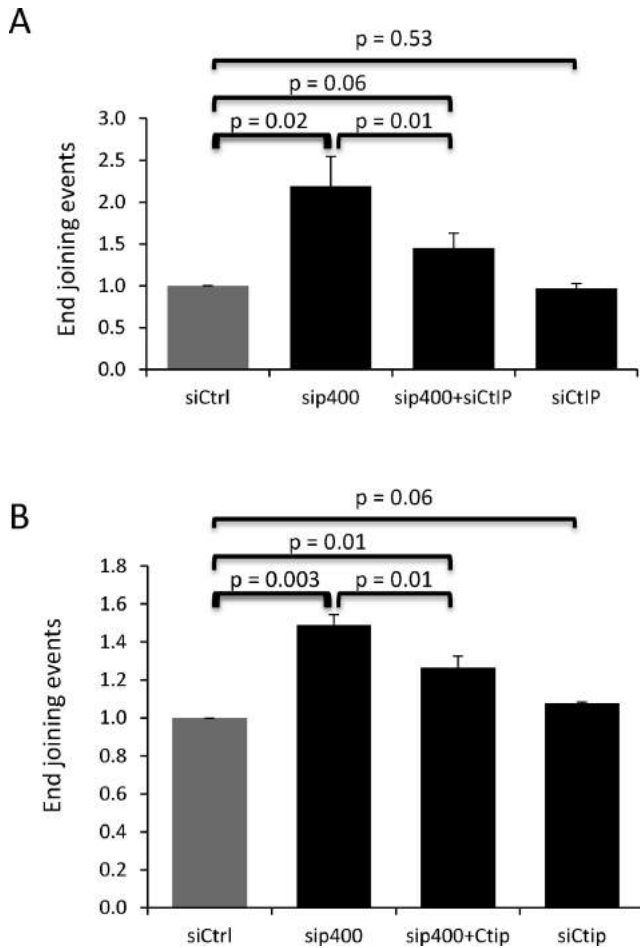
#### p400 defective cells are selectively killed by PARP inhibitor

Data shown above indicate that DSBs subjected to large resection are repaired by HR, or, if HR is defective, by AltEJ with the specific recruitment of PARP to DSBs. We reasoned that if the two pathways are made defective, these DSBs could be left unrepaired, leading to cell death. Such a mechanism could be the basis for the use of PARP inhibitors to kill selectively cancer cells as in the case of synthetic lethality observed for BRCA1 and BRCA2 deficiency (28,29) but also for deficiencies in other HR relevant factors such as rad51 (30). To test for a potential similar synthetic



**Figure 5.** Influence of p400 depletion on the recruitment of HR and NHEJ factors at DSB. (A) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiment performed on U2OS-AsiSI cells. DSBs were induced by OHTam addition and ChIP experiments were performed with Rad51 and XRCC4 antibodies. One representative experiment from three totally independent experiments is shown. For each conditions, three different DSBs were examined together with the P0 as control. Mean and standard deviation have been calculated on the PCR values. (B) Generation of single strand DNA around DSB was evaluated in U2OS-AsiSI cells on two different DSBs. Cells were transfected with p400 siRNA and 48 h later DSBs were induced by OHT addition during 4 h. Typical experiment (from three independent experiment) is shown with mean and sd from PCR performed in triplicate.

lethality, we treated p400 depleted cells with the PARP inhibitor olaparib (31) and performed a cell survival assay. We observed that p400 depleted cells exhibit sensitivity to PARP inhibition whereas at the same concentration there is no toxicity in untransfected cells and cells transfected with control siRNA (Figure 7A). To demonstrate that the synthetic lethality is dependent on DSBs, we treated cells with ionizing radiations. We found that the synthetic lethality between p400 depletion and PARP inhibition is much more prominent on irradiated cells (Figure 7A), indicating that the observed co-lethality is dependent on the presence of DSBs. Interestingly, PARP inhibitors are only effective on p400-depleted cells, suggesting that PARP inhibitors could be used to selectively eliminate cells harboring genetic instability resulting from p400 defect. Accordingly we show that treating p400-depleted cells with PARP inhibitor reverses IR-induced mutagenesis (Figure 7B) as well as genetic instability at the chromosomal level (Figure 7C) confirming their link with AltEJ. Moreover, it indicates that treatment with PARP inhibitor could be a very efficient way to get rid of cancer cells defective for p400.



**Figure 6.** DNA resection via CtIP participates in the generation of p400 mediated-AltEJ events. (A) U2OS-EJ2 cells were transfected with p400 or CtIP siRNAs independently or co transfected with p400 and CtIP siRNAs then AltEJ events measured. Results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. (B) GC92 cells were transfected with p400 or CtIP siRNAs independently or co transfected with p400 and CtIP siRNAs then frequency of NHEJ events were measured. Results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

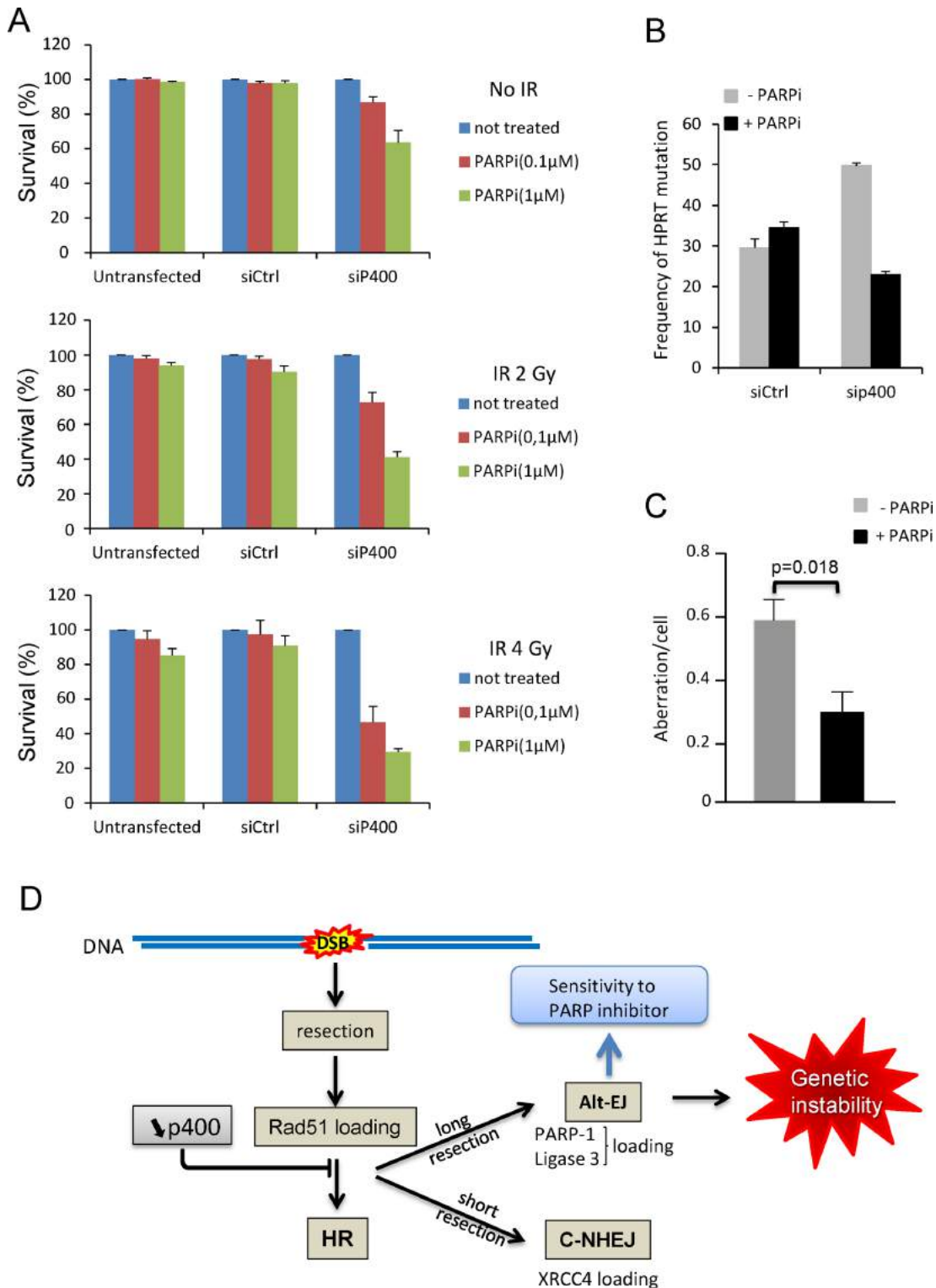
## DISCUSSION

Previous works reported contradictory findings on the role of p400 on DSB repair by HR and NHEJ (14,15,32). These discrepancies could result from the approach used: siRNA vs shRNA, overexpression of mutant inactive protein but also from the reporter substrates used to measure DNA repair efficiency. Thus, we decided to use a panel of cell lines with different reporter systems in order to obtain a clear overview of the role of p400 in DSB repair. Using various cellular reporter systems designed for monitoring DSB repair by NHEJ, we obtained results which at first glance could be inconsistent. However, all these results could be reconciled after close examination of the specific features of each substrate together with sequencing experiments. Indeed, we discovered that p400 participates in the control of AltEJ pathway and prevents large deletions at DSBs to occur. In contrast to what was shown for H2A.Z, and in agree-

ment with our previously published results, we did not find any effect of p400 depletion on classical NHEJ pathway.

Our data show that the use of several substrates should be recommended in future studies on DSB repair. In particular, we found that some substrates do not allow the detection of large deletion events, since such events result in the removal of features required for the expression of the reporter gene (promoters or ATG, for example). As a consequence, the use of these reporter substrates underestimates NHEJ-dependent events, and may prevent the observation of pathways leading to large deletions, such as the AltEJ pathway. Reassessment of previous results obtained using such reporter systems could be useful. We further show the recruitment of AltEJ factors (PARP and DNA ligase 3) to specific DSB (in the context of p400 depletion, see Figure 4). To our knowledge, this is the first demonstration of such recruitment. Our data could thus represent the bases for future studies dedicated to investigate the determinants of the recruitment of AltEJ factors to DSB. Altogether, these data indicate that p400 could be of particular importance for controlling DSB repair and could be seen as a brake to AltEJ use. We also provide important insights into the mechanisms by which p400 prevents the use of AltEJ: First the increase of AltEJ is blocked by the inhibition of resection. Moreover, recruitment of AltEJ proteins correlates with the decrease in the recruitment of Rad51, a key factor of the HR pathway. We also previously showed that formation of BRCA1 foci, another feature of HR is defective upon p400 depletion (14). These data indicate that AltEJ functions in p400 depleted cells as a back-up pathway to repair DSBs that are normally repaired by HR. We therefore propose the following model for the role of p400 in DSB repair (Figure 7D). In the absence of p400, resection takes place normally on the DSB that should be repaired by HR (see model on Figure 7D). HR-mediated repair is not completed due to the lack of loading of Rad51 on single strand DNA. Although some breaks with minor resection are probably redirected towards classical NHEJ the back-up pathway AltEJ takes charge of DSB harboring large resection, leading to large deletions (21,33). It should be noted that we do not observe Pol Q dependent insertions, that were recently shown to occur when HR is not functional and replaced by AltEJ showing genetic interaction between HR and AltEJ through pol Q (34,35). It suggests that the AltEJ mechanism observed upon p400 depletion is different from the mechanisms observed upon depletion of factors of the HR pathway. The reason for this difference is unclear for the moment, but could be related on the effects of p400 on specific gene transcription, which may result in changes in the expression of some AltEJ factors or regulators, leading to a slightly different mutagenic signature with different processing of the breaks depending on the context. We can speculate that the increase in the recruitment of AltEJ factors is not only due to the presence of single strand DNA but indeed p400 actively block PARP and DNA ligase3 loading onto chromatin. This assumption is supported by the observation that rad51 depletion (decreasing HR but not perturbing resection and ssDNA generation) did not lead to PARP1 and DNA ligase3 recruitment to DSB (Supplemental Figure S8). To check the potential involvement of G1 arrest and the channelling to AltEJ because G1 cells are not





**Figure 7.** p400 deficient cells are selectively sensitive to PARP inhibition. (A) Cells transfected with Ctrl or p400 siRNAs were treated with the PARP inhibitor olaparib and exposed or not to ionizing radiations and let grow for 10 days before colonies counting. The number of colonies in untreated cells (without olaparib) was set at 1. Results are from one representative experiment performed in triplicate on which mean and sd were calculated. The same experiment was repeated in totally independent experiment. (B) Effect of PARP inhibition on HPRT mutagenesis. Cells transfected with Ctrl or p400 siRNAs were treated or not with olaparib (1 μM) and exposed to ionizing radiations then selected for HPRT mutants by 6-thioguanine treatment. Results are expressed as frequency of HPRT mutation per million living cells. Results are from one representative experiment performed in triplicate. The same experiment was repeated in totally independent experiment. (C) Effect of PARP inhibition on chromosomal aberrations. Cells transfected with p400 siRNAs were treated or not with olaparib (1 μM) and exposed to ionizing radiations (2 Gy). Metaphase spreads were prepared and aberrations scored. For sip400 transfected cells untreated and treated with PARP inhibitor ( $n = 52$ ) and ( $n = 53$ ) metaphases were examined, respectively. Results are presented as mean  $\pm$  standard error. (D) schematic representation of the p400 role in controlling HR and Alt-EJ and its consequences on genetic instability.

loading Rad51, we evaluated the cell cycle profile of U2OS EJ2 cells after p400 depletion and observed few effect on cell cycle arrest in G1 (Supplemental Figure S9). These results were reinforced by performing co depletion of p21 and p400 to abrogate potential G1 block showing that after p21 depletion there still increased level of AltEJ events. Together these results show that potential block in G1 influenced only marginally the AltEJ events induced after p400 depletion. Our data demonstrate that AltEJ inhibition by p400 is not totally due to defects in the HR pathway or change in cell cycle distribution but rather represents the ability of p400 to interfere or control AltEJ processes.

Strikingly, we do not find any effect of Tip60 depletion on AltEJ activity measured using the two different cell systems present in U2OS EJ2 and GC92 cells (Supplemental Figure S6). However, a recent study found that Tip60 depletion decreased the occurrence of AltEJ events (36). These data could indicate that the role of p400 in the AltEJ process is independent of the Tip60 complex. Alternatively, the function of Tip60 in DNA damage signaling through acetylation of ATM (37) could prevent any analysis of its role in later events of DNA damage repair.

Importantly, our results could explain, at least in part, the concept of synthetic lethality between PARP inhibitors and defective HR (through mutations in BRCA1) as well as the relative absence of clear link between PARP inhibition, base excision repair (BER) and toxicity. Synthetic lethality with PARP inhibitor has been attributed to the combined defect in HR pathway together with the inhibition of the repair of endogenous DNA damage by PARP and BER generating single strand breaks. However, the absence of effects of XRCC1 depletion (an actor of the BER pathway acting at the first step of the process) raises the question of the BER activity via PARP in the efficiency of PARP inhibitor to kill cells (38). One possible explanation was given by Patel et al. describing the potential involvement of NHEJ in this process (39). However, they reported that NHEJ defects diminish the PARP inhibitor lethality. These results can be reconciled in view of our results. DNA breaks that should be repaired by HR are redirected to AltEJ when HR is defective (in BRCA1 mutants for example), in a mechanism involving PARP. The use of PARP inhibitors would inactivate this backup pathway, and DSBs would remain unrepaired, leading to cell death. As a consequence, the efficiency of PARP inhibitors would be mediated by the role of PARP in AltEJ and its recruitment to DSB rather than its general role on BER.

We previously showed that colon cancers show defects in p400 expression (40). Such observation could highlight a new target to treatment using PARP inhibitors because of defective HR and because of the increased need of PARP to repair DSB by AltEJ. More generally, our data suggest that p400 deficient cells could be efficiently suppressed by PARP inhibitors. As such, the p400 status of cancer cells could have predictive clinical value to orientate therapy towards PARP inhibitors.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the Toulouse Genotoul TRI facilities (LBCMCP/FRBT) for flow cytometry. We are grateful to the Non-Invasive Exploration service – US006 for the access to the irradiator (Biobeam 8000). We thank Dr J Stark (Duarte, CA) for providing us with the U2OS-EJ2 cell line. We thank Marion Aguirrebengoa for her assistance in performing statistical analyses. G-C T-T was supported by a fellowship from the gabonian government.

## FUNDING

EDF (Electricité de France, conseil de radioprotection) [RB2014-19 to Y.C.]; Fondation ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer) as a programme ARC [1291 to D.T.]; Agence Nationale de la Recherche (ANR) [SVSE8 PiNGS to D.T.]. Funding for open access charge: EDF [RB2014-19].

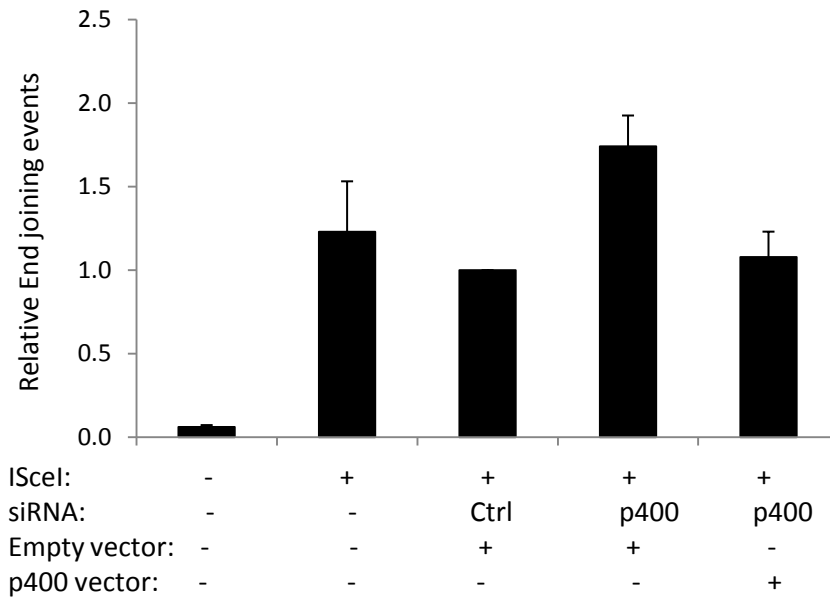
*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

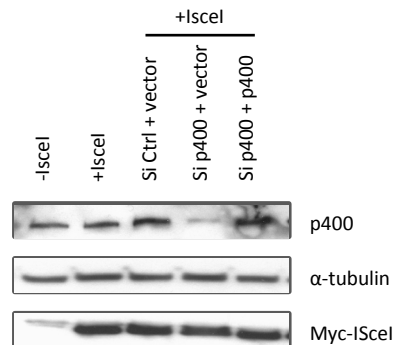
- Rothkamm,K., Kruger,I., Thompson,L.H. and Lobrich,M. (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5706–5715.
- Guirouilh-Barbat,J., Huck,S. and Lopez,B.S. (2008) S-phase progression stimulates both the mutagenic KU-independent pathway and mutagenic processing of KU-dependent intermediates, for nonhomologous end joining. *Oncogene*, **27**, 1726–1736.
- Huertas,P. (2012) DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 11–16.
- Thompson,L.H. (2012) Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutat. Res.*, **751**, 158–246.
- Guirouilh-Barbat,J., Rass,E., Plo,I., Bertrand,P. and Lopez,B.S. (2007) Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 20902–20907.
- Simsek,D., Brunet,E., Wong,S.Y., Katyal,S., Gao,Y., McKinnon,P.J., Lou,J., Zhang,L., Li,J., Rebar,E.J. et al. (2011) DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genet.*, **7**, e1002080.
- Ghezraoui,H., Piganeau,M., Renouf,B., Renaud,J.B., Sallmyr,A., Ruis,B., Oh,S., Tomkinson,A.E., Hendrickson,E.A., Giovannangeli,C. et al. (2014) Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol. Cell*, **55**, 829–842.
- Murr,R., Loizou,J.I., Yang,Y.G., Cuenin,C., Li,H., Wang,Z.Q. and Herceg,Z. (2006) Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Cell. Biol.*, **8**, 91–99.
- Aymard,F., Bugler,B., Schmidt,C.K., Guillou,E., Caron,P., Briois,S., Iacovoni,J.S., Daburon,V., Miller,K.M., Jackson,S.P. et al. (2014) Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 366–374.
- Pfister,S.X., Ahrabi,S., Zalmas,L.P., Sarkar,S., Aymard,F., Bachrati,C.Z., Helleday,T., Legube,G., La Thangue,N.B., Porter,A.C. et al. (2014) SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability. *Cell Rep.*, **7**, 2006–2018.
- Gospodinov,A., Vaissiere,T., Krastev,D.B., Legube,G., Anachkova,B. and Herceg,Z. (2011) Mammalian Ino80 mediates double-strand break repair through its role in DNA end strand resection. *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 4735–4745.
- Smeenk,G., Wiegant,W.W., Vrolijk,H., Solari,A.P., Pastink,A. and van Attikum,H. (2010) The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *J. Cell Biol.*, **190**, 741–749.

13. Lan, L., Ui, A., Nakajima, S., Hatakeyama, K., Hoshi, M., Watanabe, R., Janicki, S.M., Ogiwara, H., Kohno, T., Kanno, S. *et al.* (2010) The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Mol. Cell*, **40**, 976–987.
14. Courilleau, C., Chailleux, C., Jauneau, A., Grimal, F., Briois, S., Boutet-Robinet, E., Boudsocq, F., Trouche, D. and Canitrot, Y. (2012) The chromatin remodeler p400 ATPase facilitates Rad51-mediated repair of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.*, **199**, 1067–1081.
15. Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y. and Price, B.D. (2012) Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol. Cell*, **48**, 723–733.
16. Taty-Taty, G.C., Courilleau, C., Quaranta, M., Carayon, A., Chailleux, C., Aymard, F., Trouche, D. and Canitrot, Y. (2014) H2A.Z depletion impairs proliferation and viability but not DNA double-strand breaks repair in human immortalized and tumoral cell lines. *Cell Cycle*, **13**, 399–407.
17. Jacquet, K. and Cote, J. (2014) DNA repair: Chromatin remodeling without H2AZ. *Cell Cycle*, **13**, 1059.
18. Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N. and Stark, J.M. (2008) Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet.*, **4**, e1000110.
19. Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D. and Legube, G. (2010) High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.*, **29**, 1446–1457.
20. Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L. and Lopez, B.S. (2004) Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell*, **14**, 611–623.
21. Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2009) Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 819–824.
22. Zhou, Y., Caron, P., Legube, G. and Paull, T.T. (2014) Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Res.*, **42**, e19.
23. Mattera, L., Courilleau, C., Legube, G., Ueda, T., Fukunaga, R., Chevillard-Briet, M., Canitrot, Y., Escaffit, F. and Trouche, D. (2010) The E1A-associated p400 protein modulates cell fate decisions by the regulation of ROS homeostasis. *PLoS Genet.*, **6**, e1000983.
24. Canitrot, Y., Cazaux, C., Frechet, M., Bouayadi, K., Lesca, C., Salles, B. and Hoffmann, J.S. (1998) Overexpression of DNA polymerase beta in cell results in a mutator phenotype and a decreased sensitivity to anticancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12586–12590.
25. Audebert, M., Salles, B. and Calsou, P. (2004) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.*, **279**, 55117–55126.
26. Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F. and Iliakis, G. (2005) DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res.*, **65**, 4020–4030.
27. 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.
28. Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C. *et al.* (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, **434**, 917–921.
29. Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J. and Helleday, T. (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, **434**, 913–917.
30. McCabe, N., Turner, N.C., Lord, C.J., Kluzek, K., Bialkowska, A., Swift, S., Giavara, S., O'Connor, M.J., Tutt, A.N., Zdzienicka, M.Z. *et al.* (2006) Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.*, **66**, 8109–8115.
31. Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H. and Jasin, M. (2011) Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell*, **145**, 529–542.
32. Xu, Y., Sun, Y., Jiang, X., Ayrapetov, M.K., Moskwa, P., Yang, S., Weinstock, D.M. and Price, B.D. (2010) The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. *J. Cell Biol.*, **191**, 31–43.
33. Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J. and Lopez, B.S. (2012) Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am. J. Cancer Res.*, **2**, 249–268.
34. Mateos-Gomez, P.A., Gong, F., Nair, N., Miller, K.M., Lazzarini-Denchi, E. and Sfeir, A. (2015) Mammalian polymerase theta promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature*, **518**, 254–257.
35. Ceccaldi, R., Liu, J.C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M.I., O'Connor, K.W., Konstantinopoulos, P.A., Elledge, S.J., Boulton, S.J. *et al.* (2015) Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Poltheta-mediated repair. *Nature*, **518**, 258–262.
36. Howard, S.M., Yanez, D.A. and Stark, J.M. (2015) DNA damage response factors from diverse pathways, including DNA crosslink repair, mediate alternative end joining. *PLoS Genet.*, **11**, e1004943.
37. Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N. and Price, B.D. (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 13182–13187.
38. Boboila, C., Oksenyich, V., Gostissa, M., Wang, J.H., Zha, S., Zhang, Y., Chai, H., Lee, C.S., Jankovic, M., Saez, L.M. *et al.* (2012) Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 2473–2478.
39. Patel, A.G., Sarkaria, J.N. and Kaufmann, S.H. (2011) Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 3406–3411.
40. Mattera, L., Escaffit, F., Pillaire, M.J., Selves, J., Tyteca, S., Hoffmann, J.S., Gourraud, P.A., Chevillard-Briet, M., Cazaux, C. and Trouche, D. (2009) The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene*, **28**, 1506–1517.

A

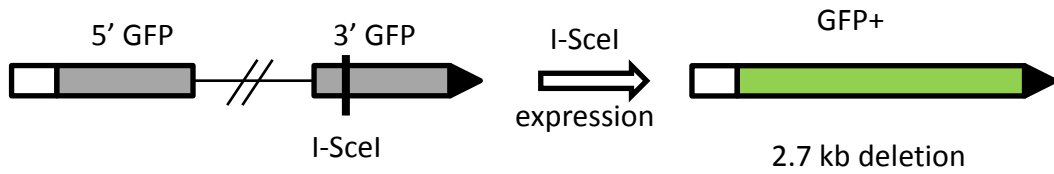
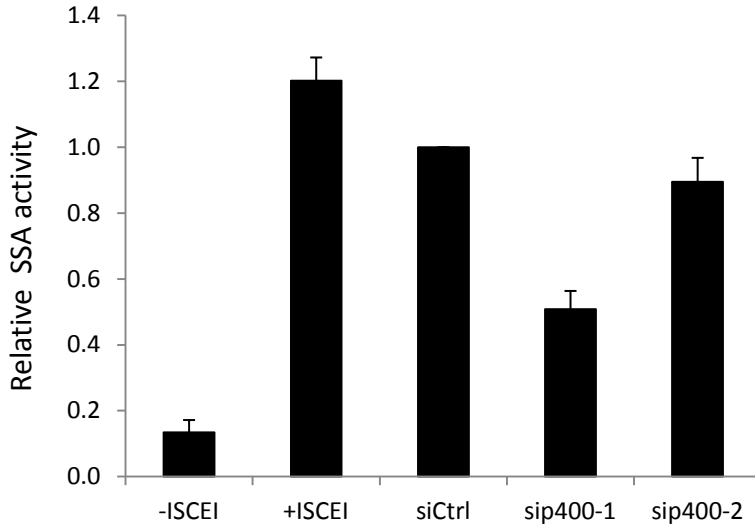
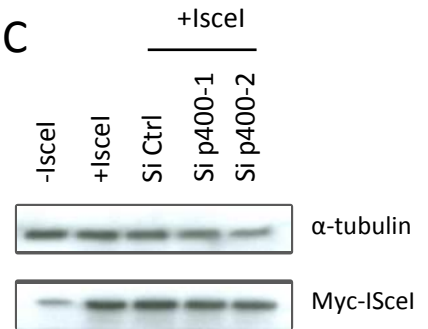


B



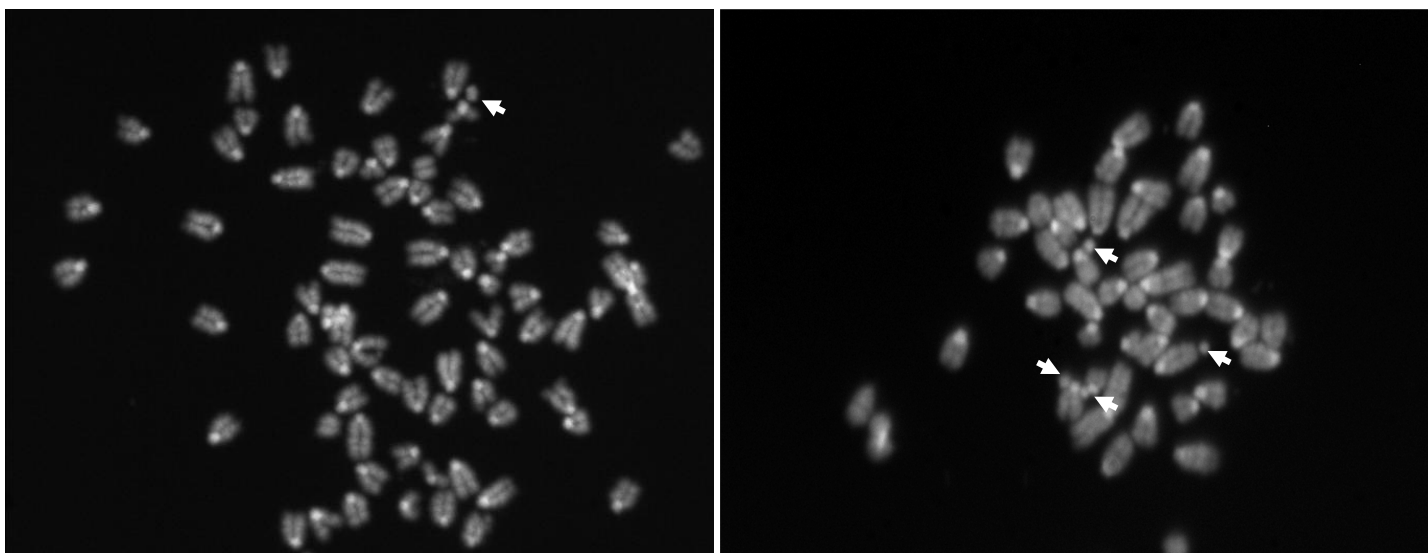
**Supplemental Figure S1:** Complementation experiment in GC92 cells using siRNA against p400 and p400 plasmid insensitive to p400 siRNA. (A) relative NHEJ activity in GC92 cells. (B) Western blot showing the efficiency of p400 depletion and its complementation by expression of a p400 coding plasmid. The level of I-SceI expression is also shown. Results are the mean  $\pm$  sd from three independent experiments



**A****B****C**

**Supplemental Figure S2:** Effect of p400 depletion on single strand annealing (SSA) activity using an U2OS cell line containing specific substrate designed to measure SSA.

(A) Schematic representation of the substrate designed to measure SSA stably integrated in cells (Bennardo et al 2008) (B) measurement of SSA activity. Results are the mean +/- sd from 3 independent experiments. (C) Western blot showing I-SceI expression.

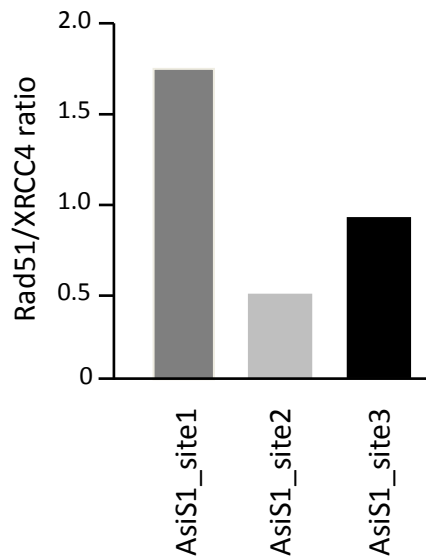


p400 <sup>+/+</sup>

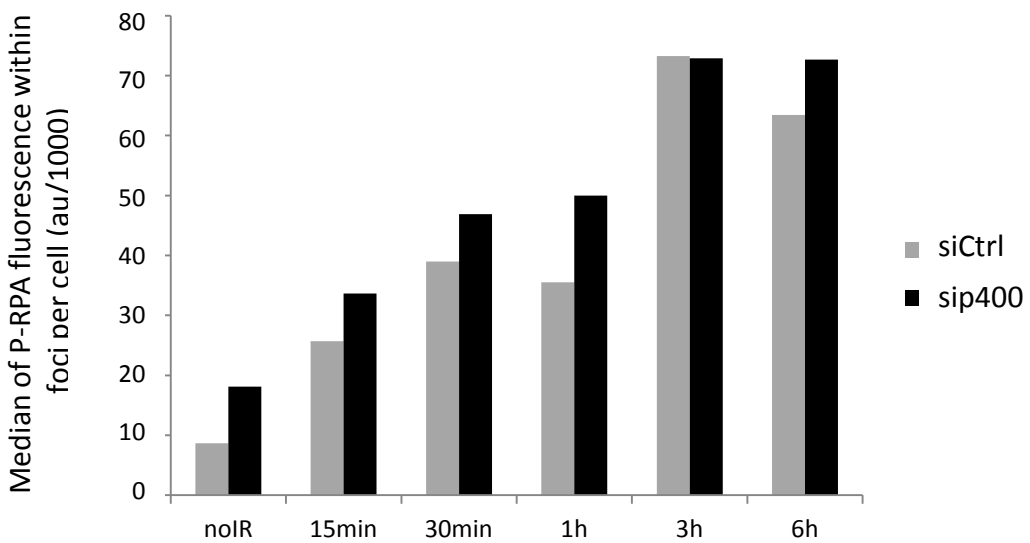
p400 <sup>Δ/Δ</sup>

	unirradiated	irradiated
p400 <sup>+/+</sup>	10/761 (1.5%)	44/752 (5.8%)
p400 <sup>Δ/Δ</sup>	25/440 (5.7%)	24/227 (10.6%)

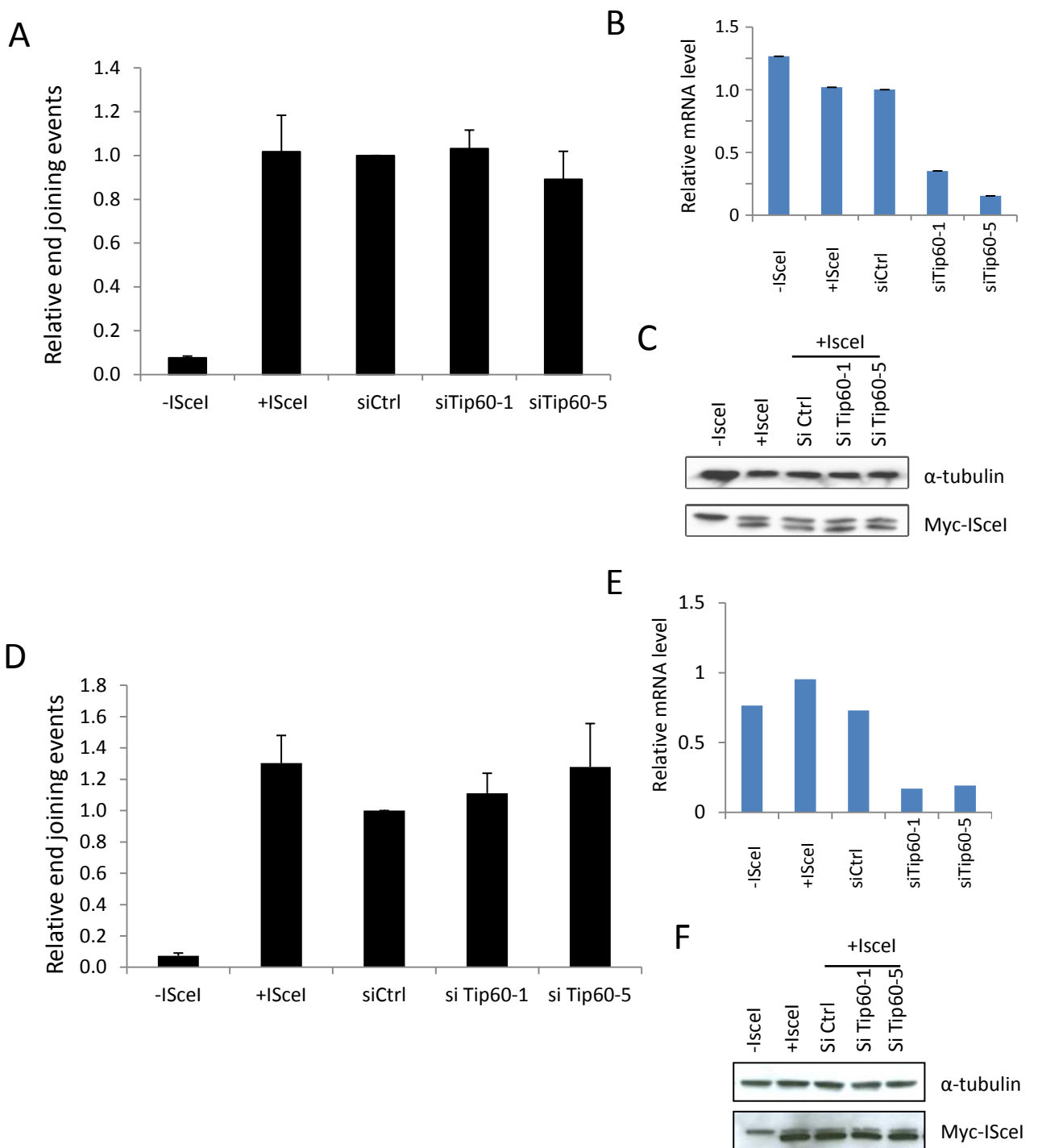
**Supplemental Figure S3:** Genetic instability in mouse embryonic fibroblasts from transgenic mice defective for p400 (Ueda et al 2007). Upper panel: examples of metaphase spreads from p400 <sup>+/+</sup> and p400 <sup>Δ/Δ</sup> MEFs (arrows indicate pieces of broken chromosome). Lower panel: quantification of the number of chromosomes breaks. Percentages are expressed as the ratio of chromosomes breaks vs the total number of chromosomes examined. Counting were performed on unirradiated cells and after ionizing radiations exposure (4Gy).



**Supplemental Figure S4:** Classification of the AsiS1 site according to the ratio of rad51 vs XRCC4 binding after DSB induction. Results are from ChIP experiment performed on U2OS cells after DSB induction by OHTam treatment. Graph is generated from results obtained in ChIP experiments in Figure 4. From these experiments site 1 is considered as a HR prone DSB, site 2 as a NHEJ prone and site 3 as a non preferential site.

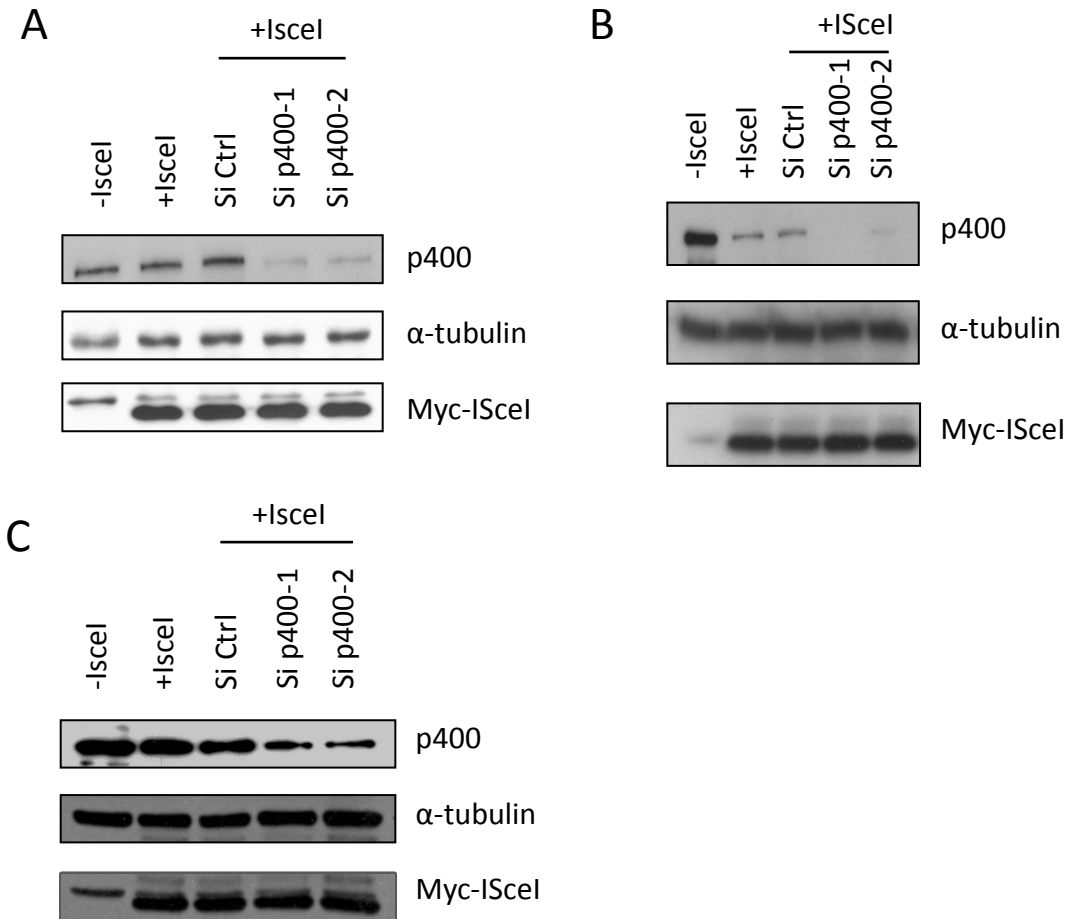


**Supplemental Figure S5.** Analysis of phospho-RPA generation in U2OS cells in response to IR (8Gy) in p400 depleted cells. Analysis was performed by automated fluorescence analysis using high content Screening system (Operetta, Perkin Elmer). Analysis was performed on at least 200 nuclei for each conditions.

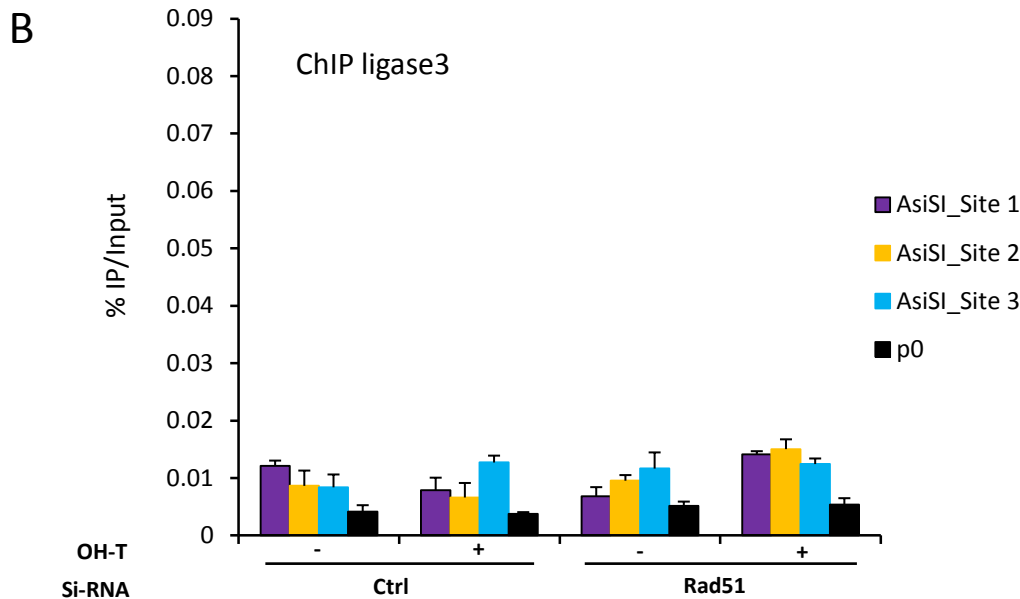
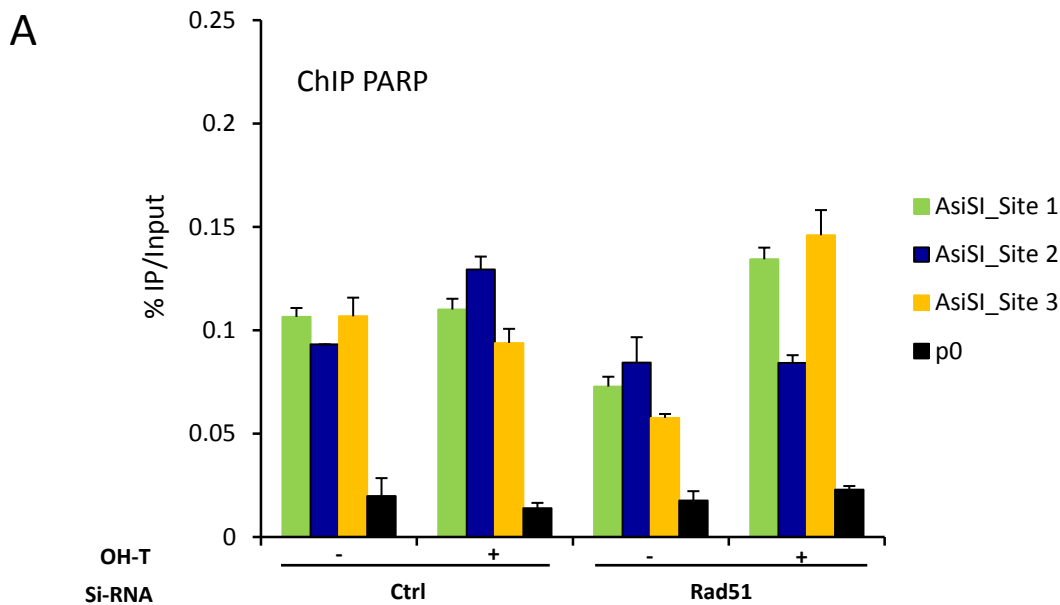


**Supplemental Figure S6: Effect of Tip60 depletion on NHEJ activity.**

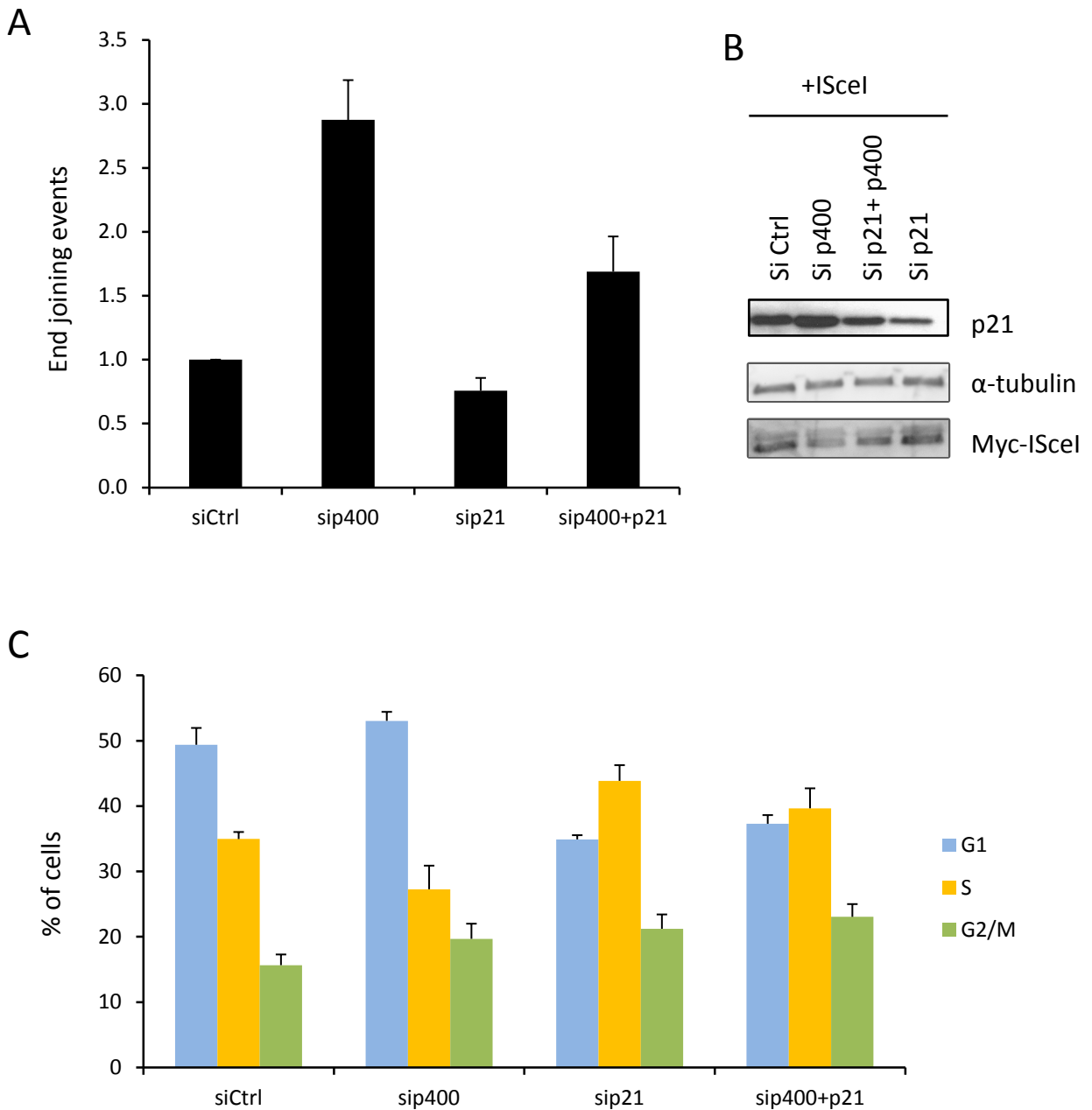
(A) Relative end joining activity in GC92 cells. Results are the mean  $\pm$  sd from 3 independent experiments (B and E) Efficiency of Tip60 depletion evaluated at the mRNA level by RT-qPCR. (C and F) Western blot showing I-SceI expression in the different conditions. (D) relative end joining activity in U2OS EJ2 cells . Results are the mean  $\pm$  sd from 3 independent experiments



**Supplemental Figure S7.** Western blot showing the specificity of the I-SceI expression through detection of the myc tag. (A) Western blot relative to figure 1B in GC92 cells. (B) Western blot relative to figure 1D in GCSH14 cells (C) Western blot relative to figure 3B in U2OS cells.



**Supplemental Figure S8.** Chromatin immunoprecipitation after rad51 siRNA mediated depletion. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiment was performed on U2OS-AsiSI cells transfected with the indicated siRNA (previously validated in Courilleau et al.). DSB were induced by OHTam addition and ChIP experiment performed with PARP1 or DNA ligase3 antibodies. For each condition 3 different DSBs were examined together with the P0 as control. One representative experiment from 2 totally independent experiments is shown. Mean and standard deviation have been calculated on the PCR values. (A) Recruitment of PARP. (B) Recruitment of DNA ligase 3. Note that no specific signal in PARP1 and DNA ligase3 ChIP is observed in Rad51 depleted cells upon DSB induction (+ OH-T).



**Supplemental Figure S9.** (A) Effect of p21 depletion on the frequency of alt-NHEJ events in p400 depleted cells. U2OS cells bearing AltEJ substrate (U2OS EJ2) were transfected with p21 or p400 siRNAs or with a combination of both siRNAs. 48h later cells were transfected with I-SceI to induce DSB. Results are the mean  $\pm$  sd of 3 independent experiments. (B) Western blot showing p21 and I-SceI expression. Note that p21 expression increased after p400 depletion as expected (Tyteca et al 2006, fig8) showing the efficiency of p400 siRNA. (C) Cell cycle distribution. Results are the mean  $\pm$  sd of 3 independent experiments.



## Supplemental Materials and Methods

### Analysis of Phosphorylated RPA

Cells were seeded in 96 well plates at a density of xxx and transfected with the indicated siRNA Using INTERFERIN according to the manufacturer's instructions (Ozyme). Forty eight hours after Transfection cells were irradiated with ionizing radiations (8 Gy) and fixed with PFA at different time post IR.

### SSA measurement

U2OS SSA cells were transfected with siRNA (10 nM) using Interferin (Ozyme) according to the manufacturer's instructions. 24 hours after, cells were transfected with I-SceI coding plasmid using JetPei (Ozyme) according to the manufacturer's instructions. 72 hours after, cells were trypsinized and analyzed by flow cytometry (BD Facscalibur) to detect GFP expressing cells. Percentage of GFP positive cells was calculated after analysis on 25000 sorted events.

### Effect of p21 depletion on AltEJ events

U2OS EJ2 cells were transfected with the same amount of siRNA (20 nM) in each conditions. 10 nM of siCtrl was added in p21 and p400 to keep the final concentration of siRNA identical in all samples. The following of the procedure was identical to the one described in materials and methods.

### Sequences of the siRNAs used

UGAAGAAGGUUCCCAAGAA-dTdT : sip400-1  
CGACACAUUGGAUACAGAA-dTdT : sip400-2  
ACGGAAGGUGGAGGUGGUU-dTdT : siTip60-1  
GGACGUAAGAACAAGAGUU-dTdT : siTip60-5  
CGUACGCGAAUACUUCGA-dTdT : siCtrl  
GCUAAAACAGGAACGAAUC-dTdT : siCtiP

## Supplemental references

Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., and Stark, J.M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet* 4, e1000110.

Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Ogawa, H., Fukuyama, H., Higashi, Y., Nagata, S., and Fukunaga, R. (2007). Critical role of the p400/mDomino chromatin-remodeling ATPase in embryonic hematopoiesis. *Genes Cells* 12, 581-592.

### **III-Discussion et Perspectives**

Mes travaux de thèse se situent dans une démarche de compréhension du rôle de l'ATPase p400 et du variant H2A.Z dans les mécanismes de réparation des DSB. La stabilité du génome et le contrôle de la transmission fidèle de l'information génétique aux cellules filles sont des points centraux dans la vie des cellules eucaryotes qui ont développé des mécanismes pour réparer les nombreux dommages auxquelles elles sont soumises tous les jours.

#### **III-A H2AZ: des résultats en désaccord avec la littérature**

Nos résultats montrent que H2AZ n'est pas impliqué dans les mécanismes de réparation des DSB. J'ai précédemment expliqué que ces résultats sont controversés, parce qu'ils sont en désaccord avec ceux publiés par l'équipe de Price en 2012 mais aussi avec les travaux de Alatwi et Downs (2015). Je vais ici détailler les possibles raisons de ces différences.

##### **- siRNA vs ShRNA**

Alors que nous utilisons des siRNA pour la déplétion de H2A.Z, l'équipe de Price et coll. utilise des shRNA pour dépléter H2A.Z. Dans le but d'avoir une inhibition plus importante et surtout qui dure plus longtemps, il serait intéressant de vérifier, dans nos cellules, l'effet de la déplétion de H2A.Z par shRNA sur les mécanismes de réparation. L'équipe de Price utilise une déplétion par shRNA qui est plus forte et longue que dans notre étude. On peut supposer que dans notre cas la déplétion de H2A.Z n'est pas suffisante. Cependant, nous avons essayé de la prolonger et de l'intensifier en réalisant deux transfections consécutives avec des siRNA H2A.Z mais dans ces conditions on observe une mortalité cellulaire très importante. Il ne semble donc pas possible dans notre cas d'obtenir le même niveau de déplétion que dans l'étude de Price et coll. (Xu et al., 2012).

##### **- Recrutement de H2A.Z aux cassures**

En ce qui concerne l'étude du recrutement de H2A.Z au niveau de la DSB réalisée par ChIP, nous utilisons l'endonucléase AsiSI pour induire les DSB et nous examinons trois sites de DSB différents alors que l'équipe de Price utilise l'endonucléase FokI couplée à une séquence en doigt de zinc pour induire une DSB unique. Leurs expériences de ChIP sont donc réalisées au niveau d'une seule coupure enzymatique. H2A.Z est distribué de façon hétérogène dans le génome, cette distribution pourrait être différente entre les trois sites que nous avons étudiés et le site qu'a étudié l'équipe de Price et coll. Par ailleurs, d'autres travaux ont montré chez l'homme que le complexe INO80 élimine très rapidement H2A.Z de la chromatine au site des

dommages (Alatwi and Downs, 2015). Cette étude montre que l'éviction de H2A.Z de la chromatine est la principale fonction d'INO80 et/ou ANP32E qui favorisent ainsi la réparation des dommages par RH. Ces travaux pourraient apporter une explication à nos résultats sur l'absence de recrutement de H2A.Z observée au site de la DSB par ChIP puisqu'ils montrent la précocité de l'éviction de H2A.Z du site des dommages. D'où la nécessité d'examiner le recrutement de H2A.Z à des temps plus courts post-induction des DSB et par exemple de fixer nos cellules 30 minutes après l'induction des DSB lors des prochaines expériences de ChIP pour étudier le recrutement de H2A.Z.

Cependant, nous avons également analysé le recrutement de H2A.Z à la cassure après irradiation laser via le recrutement d'une forme de H2A.Z étiquetée avec la GFP. Là aussi nous n'observons pas de recrutement alors que dans l'étude d'Alatwi et Downs, réalisée également dans des cellules U2OS avec une forme étiquetée de H2A.Z, ils observent le recrutement rapide et transitoire de H2A.Z-GFP aux cassures. Dans notre cas, que les temps soient longs ou courts nous n'observons pas de relocalisation de H2A.Z-GFP au niveau de la cassure.

Il faut noter que dans nos cellules, nous n'observons aucun effet significatif de la déplétion de H2A.Z en terme de sensibilité aux radiations ionisantes, ce qui confirme que, dans notre système d'étude, le variant H2A.Z n'intervient pas dans la réponse aux dommages à l'ADN. Cependant, la déplétion de H2AZ dans nos cellules provoque un phénotype puisque cette déplétion influence le cycle cellulaire et la prolifération.

### - **Mutation de H2A.Z**

Chez la levure, la mutation du gène *H2AFZ* codant pour H2A.Z conduit à l'instabilité génomique, au défaut de réparation des DSB, notamment dans la résection de l'ADN et à une sensibilité accrue aux agents endommageant l'ADN (Kalocsay et al., 2009).

Il serait également intéressant de générer des mutants de H2A.Z au niveau de son domaine carboxyterminal. En effet, la région carboxyterminale de H2A.Z possède une région riche en acides aminés acides. Au sein de la structure nucléosomique, cette région acide rejoint l'histone H2B, créant ainsi une surface d'interaction potentielle (Suto et al., 2000). Cette surface acide étendue est absente dans le nucléosome contenant l'histone principale H2A. Ainsi, nous pourrions regarder l'effet de la surexpression de ces mutants de H2A.Z dans les mécanismes de réparation des DSB chez l'homme.

### - **Choix des substrats de réparation: cas du NHEJ**

Les substrats rapporteurs que j'ai utilisés pour évaluer l'activité de réparation des DSBs présentent plusieurs limites. Ceux-ci fonctionnent avec la restauration du cadre de lecture du gène de la GFP (voir détails dans Matériels et Méthodes) comme témoin de la réparation par NHEJ. Or, le NHEJ peut être infidèle et conduire à la perte d'information génétique. Ainsi, la restauration du cadre de lecture du gène de la GFP peut ne pas se faire à cause de la perte d'information qui peut toucher l'ATG de la GFP (Figure 14 dans la partie matériel et méthodes). Il serait intéressant d'examiner l'effet de la déplétion de H2AZ en utilisant d'autres substrats qui permettent d'analyser le NHEJ. Nous pourrions utiliser les cellules GC92 et GCSH14 déjà à notre disposition et qui possèdent un substrat pour lequel la distance entre les sites de coupure I-SceI et les gènes rapporteurs CD4 ou GFP est beaucoup plus grande ce qui permettra de quantifier des événements de NHEJ subissant des résections qui pourraient être importantes. Ces derniers substrats paraissent donc mieux adaptés pour étudier le mécanisme de réparation par NHEJ.

### - **Voie RH**

Le substrat de mesure de la RH a déjà été utilisé par une autre équipe qui trouve un effet de la déplétion de H2A.Z sur la RH (Xu et al., 2012). Toutefois, même en utilisant ce substrat, nous ne trouvons aucun effet de la déplétion de H2A.Z dans la réparation des DSB par RH. La conformation du nucléosome, le niveau de compaction de la chromatine au moment de l'utilisation du substrat de mesure de la RH, pourraient être les raisons de cette absence d'effet observée. Pour la suite il faudra vérifier par immunofluorescence l'apparition des foyers RAD51 et BRCA1 dans des cellules RG37 suite à la déplétion de H2A.Z, pour vérifier si le variant H2A.Z est bien un facteur important pour la RH et voir à quelle étape il influence le processus. Une autre expérience qui devra être faite est la ChIP avec des anticorps RAD51, suite à la déplétion de H2A.Z. Cette expérience pourrait nous permettre de savoir si H2A.Z influence le recrutement des facteurs de la RH.

### - **I-SceI: expression stable/inductible**

Les systèmes rapporteurs pour la réparation des DSB utilisent des endonucléases particulières afin de générer des coupures. La plus utilisée est l'enzyme I-SceI. La séquence codant pour son site de clivage n'est pas contenue dans le génome des mammifères et il est composé de 18 pb, ce qui la rend extrêmement spécifique (Jasin and Haber, 2016). Toutefois, il existe quelques inconvénients à l'utilisation de cette enzyme. Notamment, l'expression d'I-SceI qui est très

forte après transfection transitoire. La protéine va donc en permanence dans le noyau pour générer des DSBs. Afin de s'affranchir des problèmes de transfection et de variation de quantité d'I-SceI entre les différentes conditions expérimentales il a été mis en fusion l'enzyme I-SceI avec le système dégron, pour générer une DSB unique, de façon contrôlée à la fois spatialement et temporellement. Ce système découvert chez les organismes végétaux (Nishimura et al., 2009) a été adapté, afin de pouvoir l'utiliser au sein de cellules non végétales. Egalement appelé Auxin-Inducible Degron (AID), il a été placé en fusion traductionnelle avec la protéine I-SceI. Il serait souhaitable d'utiliser ce système que notre équipe a récemment développé, dans lequel, le gène qui code pour l'endonucléase I-SceI est directement intégré dans le génome de façon stable (évitant la transfection d'un plasmide pour exprimer I-SceI). I-SceI n'est pas exprimée lorsque les cellules sont cultivées en présence d'auxine (une hormone végétale) qui entraîne la dégradation d'I-SceI. Lorsqu'on lève la répression d'I-SceI, en enlevant l'auxine dans le milieu de culture, I-SceI induit des DSB de façon uniforme dans toutes les cellules.

### - Les variants de H2A.Z

Chez les vertébrés, le variant H2A.Z existe sous deux formes, H2A.Z-1 qui a d'abord été décrit comme le H2A.Z des mammifères et H2A.Z-2 (Dryhurst et al., 2009; Matsuda et al., 2010). En effet, il est maintenant connu que H2A.Z présente deux isoformes chez les vertébrés, H2A.Z-1 et H2A.Z-2, qui sont codées par des gènes différents qui produisent des protéines avec seulement trois acides aminés différents (Dryhurst et al., 2009). Les cellules déficientes en H2A.Z-2 montrent une augmentation de l'apoptose, alors que tel n'est pas le cas dans les cellules déficientes en H2A.Z-1. Cette observation suggère une fonction différente entre les deux isoformes (Matsuda et al., 2010). Une analyse par FRAP a révélé une différence de dynamique entre les variants H2AZ.1 et H2AZ.2 en réponse aux dommages à l'ADN. Cette étude indique que seul H2A.Z-2 est échangé sur les sites de la chromatine endommagée, immédiatement après l'induction de DSB. Cette étude suggère que, chez les mammifères, H2A.Z-2 est impliqué dans la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN à un stade très précoce, par l'intermédiaire de la réorganisation de la chromatine endommagée (Nishibuchi et al., 2014).

Dans notre modèle d'étude, il serait intéressant d'analyser l'effet de la déplétion spécifique de l'isoforme H2A.Z-2 sur les mécanismes de réparation, en utilisant par exemple les lignées GC92 pour la mesure du NHEJ et RG37 pour la RH. Nous pourrions aussi examiner par immunofluorescence, l'effet de la déplétion de H2A.Z-2 sur le recrutement des facteurs de la RH tels que RAD51 et BRCA1 mais aussi du NHEJ comme 53BP1. La suite de ce travail serait

aussi de regarder par ChIP, le recrutement des facteurs de la RH (RAD51) et du NHEJ (XRCC4), suite à la déplétion de H2A.Z-2.

### **- La SUMOylation de H2A.Z**

La SUMOylation de H2A.Z au niveau de la partie C-terminale sur les lysines 126 et 133 (K126 et K133), est une modification post-traductionnelle importante pour la relocalisation de H2A.Z à la périphérie du noyau lorsqu'il y a une DSB persistante chez la levure (Kalocsay et al., 2009). Notons que dans notre cas les DSB peuvent être apparentées à des DSB persistantes car suite à leur induction par I-SceI, si la réparation est fidèle, le site de coupure est restauré et peut être une nouvelle fois clivé jusqu'à la génération d'une erreur de réparation.

Toutefois, ces auteurs montrent que la mutation de SWR1 (mutants  $\Delta swr1$ ), homologue de p400, entraîne un défaut de SUMOylation de H2A.Z. Autant cette SUMOylation de H2AZ n'est pas nécessaire pour son incorporation dans la chromatine, elle semble importante pour la rétention de H2A.Z à la périphérie du noyau pour une relocalisation. Nous disons que, cette baisse de la RH observée lors de la déplétion de p400 (Courilleau et al., 2012) pourrait s'expliquer par un défaut de SUMOylation de H2A.Z qui entraîne le défaut de rétention de H2A.Z à la périphérie du noyau pour une relocalisation. Il serait intéressant de regarder l'état de la SUMOylation de H2A.Z dans les cellules déplétées en p400. Il faut noter que ces travaux sur la SUMOylation de H2A.Z ont été réalisés chez la levure et que la SUMOylation de H2A.Z n'a jamais été mis en évidence chez les mammifères. Dans l'ensemble il ressort que l'implication du variant H2AZ dans la réparation des DSB dans les cellules humaines reste à clarifier.

### **III-B- L'ATPase p400 comme gardien de la stabilité du génome.**

Il a été démontré que le ratio p400/Tip60 contrôle la voie de réponse aux dommages à l'ADN induite par un stress oncogénique et que la dérégulation de ce ratio, dans les cellules de carcinomes colorectaux, entraîne une absence d'activation de cette barrière anti-cancer (Mattera et al., 2009). D'autres travaux, dont ceux de notre équipe, ont montré que p400 influence la réponse aux dommages à l'ADN et que son inhibition et/ou déplétion provoque des défauts de réponse aux dommages à l'ADN qui seraient la source d'instabilité génétique (Courilleau et al., 2012; Xu et al., 2010). L'instabilité génétique étant un facteur clé dans la génération mais aussi dans l'évolution des cancers, nous pouvons penser que p400 joue un rôle dans le maintien de la stabilité génétique et participe à la création d'une barrière anticancéreuse.

Dans cette étude, nos résultats confirment cette dernière affirmation, puisqu'ils montrent que p400, via l'inhibition de la mutagenèse et via l'inhibition de l'induction des aberrations chromosomiques, contrôle la stabilité génétique.

Comment l'ATPase p400 peut-elle être un gardien du génome ? Des précédentes études (Endo et al., 2013; Macher-Goeppinger et al., 2013) établissent des corrélations entre l'expression de p400 et certaines tumeurs (Endo et al., 2013). Dans la plupart des cas il s'agit d'une surexpression de p400. Dans d'autre cas, il s'agit d'une mutation dans le gène qui code pour p400. Ce constat nous permet donc de penser que p400 pourrait prévenir l'apparition de ces tumeurs et donc être un facteur de maintien de la stabilité du génome. Il faudrait par exemple surexprimer p400 et regarder si cela a un effet sur l'instabilité génétique dans nos différents systèmes d'études de la mutagenèse et de la réparation en réponse aux dommages à l'ADN.

### **- Interactions de p400 avec les acteurs de la réparation**

Il a été montré par ChIP et par immunofluorescence que la déplétion de p400 entraîne un défaut de recrutement de la recombinaise RAD51 au site de la DSB, suggérant que p400 est nécessaire pour l'accumulation de RAD51 à la DSB (Courilleau et al., 2012). De plus, ces travaux montraient une interaction directe entre p400 et RAD51. Pour la suite, il faudra rechercher si p400 interagit avec d'autres facteurs de réparation. Cela pourra être réalisé par immunoprécipitation (IP) suivie d'une analyse par spectrométrie de masse. Pour ce faire, on pourrait utiliser la lignée cellulaire K562 qui provient d'une leucémie myéloïde humaine, dans laquelle p400 endogène a été étiqueté (EP400-tag) avec des séquences Flag et Strep (Dalvai et al., 2015). Avec cette lignée cellulaire il serait possible de faire des expériences d'immunofluorescence pour voir la colocalisation de p400 avec d'autres protéines de la réparation qui pourront être étiquetées ou pour lesquelles des anticorps sont disponibles.

D'autres expériences comme des ChIP p400 ou des westerns blots pourront plus facilement être réalisées pour examiner le recrutement de p400 à la DSB, suite à la déplétion des variants H2A.Z-2 ou 1 et suite à la déplétion de RAD51 et/ou XRCC4. Cette expérience pourra nous renseigner pour savoir si des variants d'histones ou les mécanismes de réparation des DSB, influencent le recrutement d'un facteur tel que p400.

### **- p400 inhibe l'induction des aberrations chromosomiques**

Nous avons focalisé notre analyse sur les aberrations chromosomiques. Cette analyse s'est révélée intéressante, puisqu'elle révèle une implication de p400 dans le contrôle de la stabilité du génome. Toutefois, la caractérisation des différentes aberrations chromosomique pourra être

optimisée. En effet, il est connu que les cellules déplétées pour p400 sont déficientes dans le mécanisme de réparation des DSBs par RH (Courilleau et al., 2012). Pour optimiser notre analyse, il serait intéressant d'utiliser l'hybridation in situ en fluorescence Quantitative (Q-FISH, Quantitative Fluorescence in situ hybridization). Cette technique pourrait être utilisée pour cibler des séquences télomériques dans la réalisation d'un caryotype et pour permettre par exemple la recherche de délétions au niveau des télomères. Les télomères sont des zones riches en séquences répétées avec une très grande instabilité. Il est par exemple connu que le dysfonctionnement des télomères conduit à l'instabilité génétique dans certaines pathologies (Dos Santos et al., 2015).

### **III-C- L'ATPase p400 contrôle la réparation des DSBs par NHEJ**

Les résultats de notre étude montrent une implication de l'ATPase p400 dans le contrôle de la réparation des DSB par NHEJ. Toutefois, pour réaliser cette étude, nous utilisons deux substrats rapporteurs qui ne permettent pas de trouver le même résultat suite à la déplétion de p400. En effet, avec le substrat rapporteur présent dans la lignée GC92, nous trouvons que la déplétion de p400 entraîne une augmentation des événements de réparation par NHEJ, alors qu'avec le substrat rapporteur des GCSH14, nous trouvons que la déplétion de p400 entraîne une baisse des événements de réparation par NHEJ. Afin de réconcilier ces résultats différents, nous avons examiné les caractéristiques de chacun des substrats.

Dans les cellules GC92, la distance entre le gène rapporteur CD4 et le site de coupure I-SceI est de 211 bp. Dans les cellules GCSH14 la distance entre le gène rapporteur GFP et le site de coupure I-SceI est seulement de 16 bp. La différence de distance entre chaque gène rapporteur et le site de restriction I-SceI pourrait expliquer la différence des résultats obtenus en utilisant ces substrats. En effet, suite à l'induction de la DSB par I-SceI, s'il y a une grande délétion (résection) autour du site I-SceI, le substrat rapporteur présent dans les cellules GCSH14 devient non fonctionnel, puisque la résection peut le gène de la GFP, le rendant inactif pour la mesure des événements au cytomètre. Par contre, ces événements de réparation par NHEJ qui sont invisibles avec le substrat des GCSH14, sont bien visibles avec le substrat présent dans les cellules GC92 qui dispose d'un gène CD4 qui est beaucoup plus éloigné du site de coupure I-SceI. Ainsi, dans les cellules GC92, même s'il y a une grande délétion suite à un événement de résection important, celui-ci atteint difficilement le gène rapporteur CD4 qui se situe à 211 bp. Pour cette raison, les cellules GC92 permettent de révéler les événements de réparation par NHEJ qui pourraient subir des résections importantes.



Cette comparaison montre combien il est important de connaître précisément les caractéristiques moléculaires des substrats utilisés et on peut penser que certaines études n'ont pas pris en compte ces possibilités.

### - **Le domaine ATPase de p400**

L'activité ATPase est-elle essentielle pour le rôle de p400 dans le NHEJ ? Afin de répondre à cette question il serait intéressant de surexprimer une forme de p400 mutée (p400<sup>ATPase</sup>) au niveau du domaine ATPase (Samuelson et al., 2005) et de regarder dans nos cellules l'effet sur la réparation par NHEJ. De précédents travaux avaient montré que l'activité ATPase était nécessaire pour la dynamique de la chromatine à la DSB et favorisait le recrutement BRCA1 et 53BP1 (Xu et al., 2010). Pour continuer cette étude, il serait intéressant d'examiner l'effet de la déplétion d'autres ATPases notamment SRCAP dans ces cellules. Le complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant, SRCAP joue un rôle essentiel dans l'incorporation du variant H2A.Z (Liang et al., 2016), (Wong et al., 2007). Cela pourrait nous aider à comprendre si l'effet de p400 dans le NHEJ est unique ou s'il peut être extrapolé à d'autres remodeleurs de la chromatine ayant une activité ATPase. Dans ce cas, il soulignerait l'importance d'avoir un remodelage de la chromatine ATP-dépendant.

### - **p400 et NHEJ alternatif**

Nos résultats de CHIP montrent que la présence de p400 empêche le recrutement de PARP et ligase 3 qui participent au mécanisme de réparation des DSBs par NHEJ alternatif. Nous pourrions examiner si d'autres facteurs qui ont été décrits pour leur implication dans ce processus, comme la polymérase theta, la ligase 1 et XRCC1, sont recrutés au site de la DSB, lors de la déplétion de p400.

### - **La résection des DSB**

La résection dépend-elle de p400? Est-ce que p400 influence préférentiellement le recrutement de certains facteurs de résection tels que MRN, dna2 ou des hélicases comme WRN? Tout cela pourra être testé par CHIP après déplétion de p400. Ces résultats pourraient montrer comment un facteur de la dynamique de la chromatine peut influencer une étape cruciale de la réparation des DSB.

### - **Le NHEJ alternatif remplace le NHEJ et la RH**

Le NHEJ alternatif est surtout connu comme un mécanisme de secours du NHEJ classique quand celui-ci est défectueux. Toutefois, il apparaît que le NHEJ alternatif peut aussi remplacer la RH quand la réparation est bloquée après l'étape de résection, empêchant le NHEJ classique. Ainsi, lorsque la RH est inhibée après l'étape de résection, la réparation des DSB se fait via le NHEJ alternatif, ce qui a pour conséquence la survie cellulaire. Or, lorsqu'en plus de l'inhibition de la RH, il y a aussi inhibition du NHEJ alternatif, suite au traitement des cellules aux inhibiteurs de PARP, les cellules deviennent dépourvues de mécanisme fonctionnel de réparation des DSB, d'où la mort cellulaire observée.

L'autre question est de savoir si l'utilisation du NHEJ alternatif s'accompagne toujours d'un NHEJ classique défectueux. Des premiers résultats nous montrent que la déplétion de p400 entraîne aussi le recrutement de XRCC4, un facteur clé du NHEJ classique. Ce résultat nous renseigne sur le fait que tous les facteurs du NHEJ classique ne sont pas absents lors de la réparation des DSB par NHEJ alternatif. En effet, l'activité du NHEJ-Alternatif observée lors de la déplétion de p400 dans notre étude nous laisse penser à un défaut partiel ou un ralentissement du NHEJ classique, même si dans nos résultats, nous n'observons pas un défaut du NHEJ classique. Ainsi, nous pourrions rechercher les raisons de ce potentiel ralentissement du NHEJ classique, en examinant le recrutement à la DSB des facteurs tels que Ku70/80, DNA-PK et Ligase IV, suite à la déplétion de p400. Finalement, nos résultats montrent que l'ATPase p400 est impliquée dans le mécanisme du NHEJ, notamment le NHEJ alternatif où elle intervient comme un frein pour bloquer l'utilisation de cette voie qui se révèle être très mutagène.

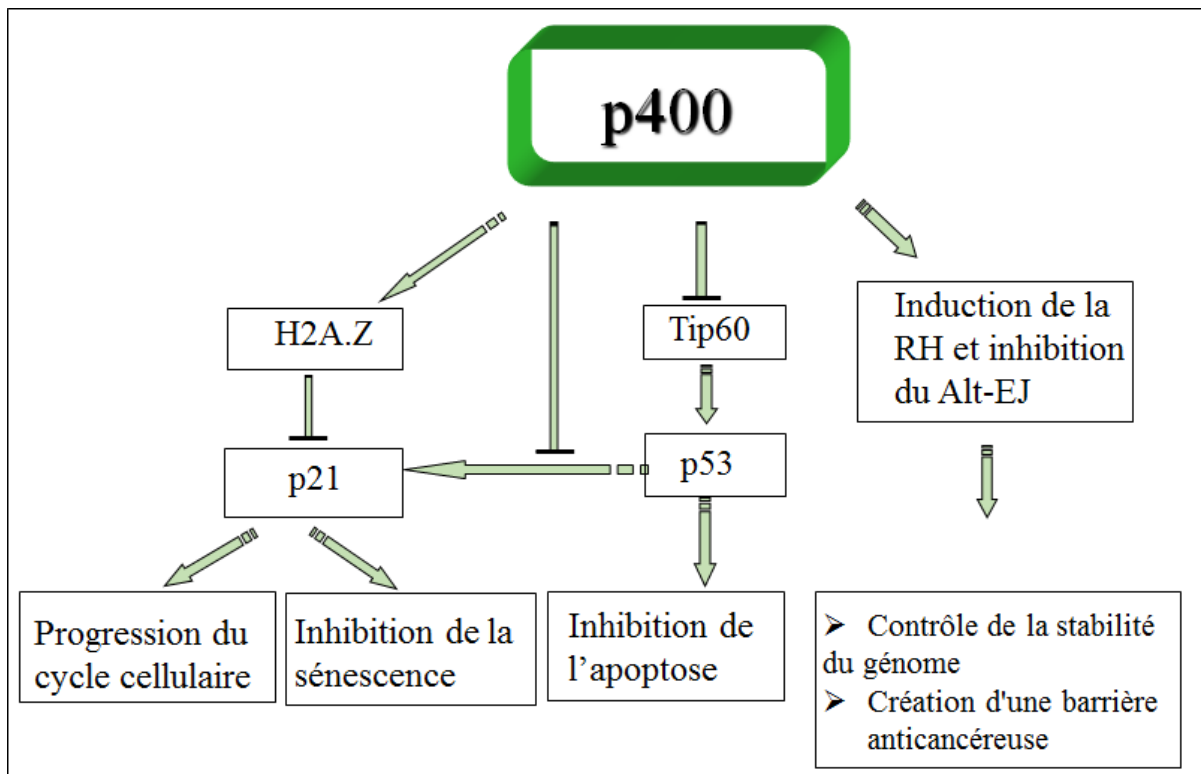
### - **p400 et tumorigenèse**

Une étude a analysé la relation entre l'expression de p400 et la survie des patients après le diagnostic RCC (Renal cell carcinoma) (Macher-Goeppinger et al., 2013). L'expression de p400 a été mesurée par immunohistochimie en utilisant un micro-réseau tissulaire contenant des échantillons de tissus tumoraux de patients atteints de RCC. La perte totale d'expression de p400 a été détectée dans 64% de tous les échantillons de tumeurs et une diminution de l'expression de p400 a été associée à un stade avancé de la tumeur, à un stade supérieur de malignité et aux métastases régionales des ganglions lymphatiques. D'une façon générale, ces tumeurs qui sont liées à p400, se caractérisent par une perte du mécanisme de suppression de tumorigenèse par la sénescence (Macher-Goeppinger et al., 2013).

La tumeur fibromyxoïde ossifiante (Ossifying fibromyxoid tumor, OFMT) est une tumeur rare des tissus mous classée comme une tumeur de différenciation incertaine à la malignité intermédiaire (rarement métastasée). Une étude a rapporté la présence d'un gène de fusion, EP400-PHF1 et la persistance de réarrangement du gène PHF1 dans l'OFMT (Gebre-Medhin et al., 2012). Le gène de fusion EP400-PHF1 est souvent présent dans l'OFMT qui semble être une tumeur caractéristique de cette translocation (Endo et al., 2013). Toutes ces études montrent une corrélation de l'expression de p400 avec plusieurs pathologies. Plusieurs mutations (plus de 250 mutations) du gène qui code pour p400 ont été rapportées sur le site du portail ICGC (International Cancer Genome Consortium). Ces mutations sont diverses et variées. Le plus souvent ce sont des délétions de 2 à 200 bp et des substitutions de bases. Ces mutations ont été associées à des tumeurs. Parmi les cas les plus fréquents, il y a les cancers du côlon et du sein. Dans les cas les plus rares, il y a les cancers du poumon et de l'œsophage. La question est de savoir si c'est la mutation de p400 qui est à l'origine de chacune des tumeurs qui ont été mentionnées ou si ces mutations apparaissent au cours de la tumorigenèse ? Dans une prochaine étude, nous pourrions générer ces mutations dans nos cellules, puis en examiner l'effet sur les mécanismes de réparation des DSB.

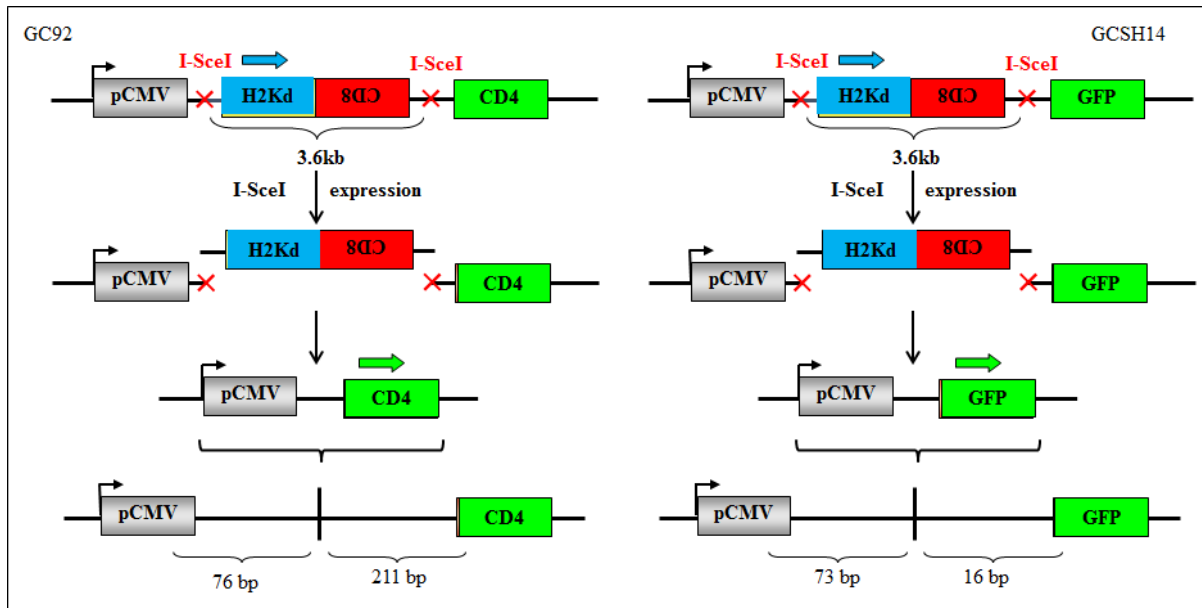
Nos travaux montrent que p400 agit comme un frein pour bloquer l'utilisation du NHEJ-Alternatif pour la réparation des DSBs. Sachant que le NHEJ-Alternatif peut être une source d'erreurs de réparation, il apparaît que p400 maintient l'intégrité du génome et pourrait agir comme une barrière anti-cancer (Figure 13).

Il apparaît ainsi que le remodelage de la chromatine à différents niveaux, incorporation de variant d'histone et remodelage ATP-dépendant, influence les mécanismes de réparation de l'ADN et la stabilité génétique. Ce travail montre un peu plus que la maintenance du génome implique la régulation fine de la chromatine et que les modifications épigénétiques collaborent ou sont imbriquées dans une fonction générale de protection du génome. Enfin, notre étude sur le rôle des modifications de la chromatine dans la réponse aux dommages à l'ADN se situe à la croisée d'un mouvement de recherche beaucoup plus global sur l'épigénétique, la stabilité du génome, et l'organisation nucléaire (Dabin et al., 2016).

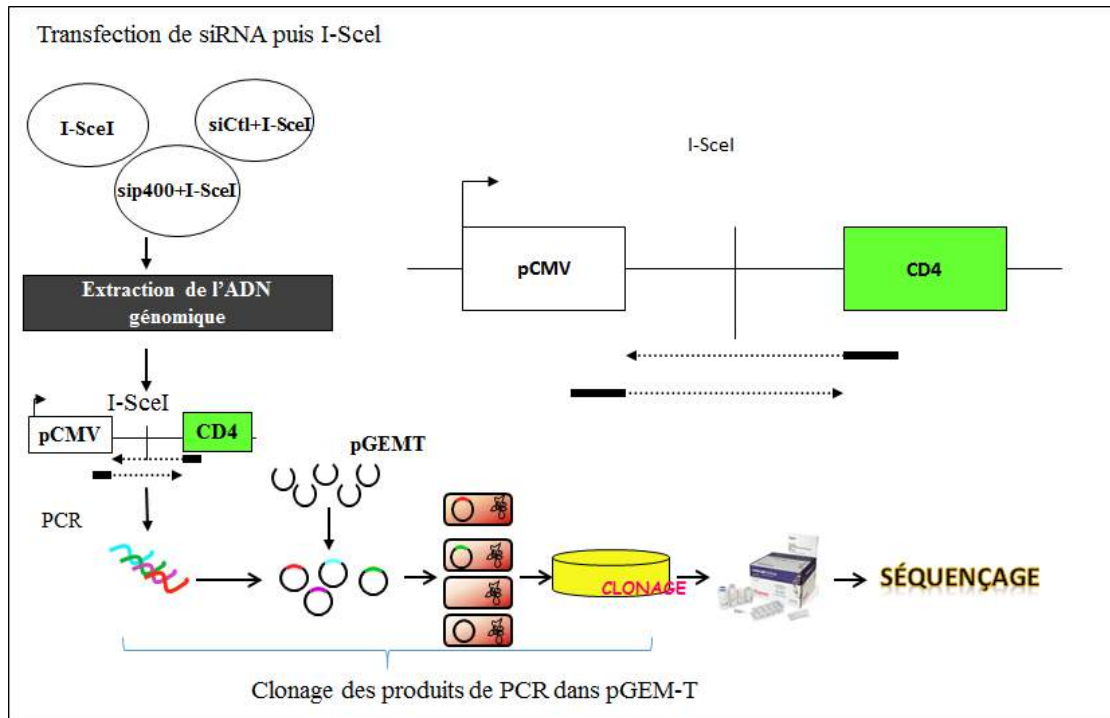


**Figure 13** : Schéma général de l'implication de p400 et H2A.Z dans différentes voies de signalisation. Suite à la réception d'un signal de stress, de transcription ou de réponse aux dommages à l'ADN, la dynamique de la chromatine impliquant les protéines p400 et H2A.Z est une étape essentielle pour l'induction d'une réponse cellulaire rapide et efficace. En effet, sur la base de nos travaux et des études antérieures il apparaît que, p400 incorpore H2A.Z dans le promoteur de p21, entraînant ainsi l'inhibition de l'expression de ce gène et la progression du cycle cellulaire. P400 peut aussi inhiber l'expression de p21 induite par p53, causant ainsi l'inhibition de la sénescence induite par cette voie de signalisation. P400, via une interaction directe, inhibe l'activité histone acétyltransférase de Tip60. Il en résulte que Tip60 perd sa capacité à induire l'apoptose via l'acétylation de p53 sur la lysine 120. Enfin, p400 favorise la réparation des DSBs par RH qui est fidèle et empêche l'utilisation du NHEJ-Alternatif qui est très mutagène. De ce fait, p400 contrôle la stabilité du génome et pourrait participer à la création d'une barrière anticancéreuse.

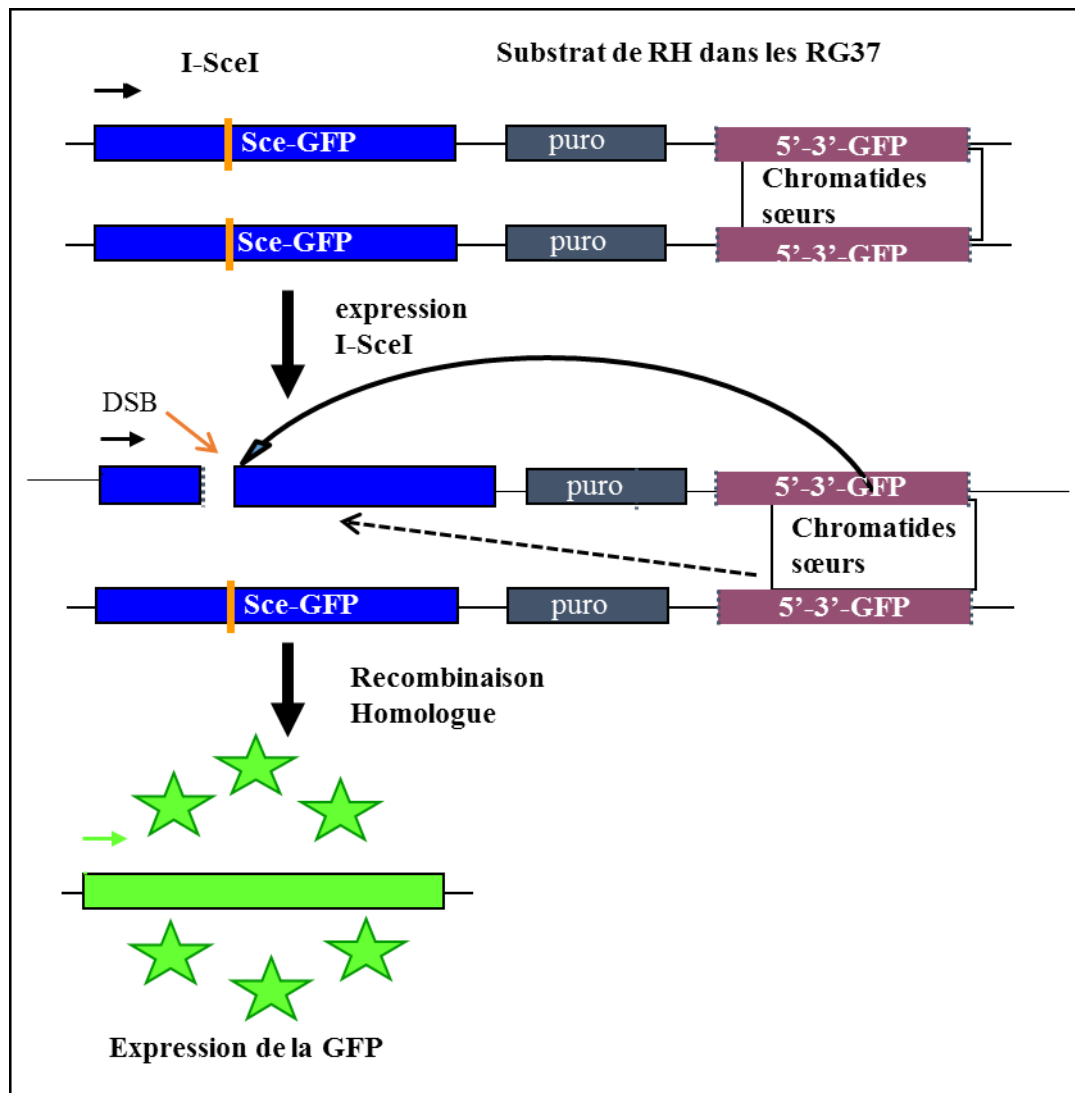
## IV- MATERIELS ET METHODES



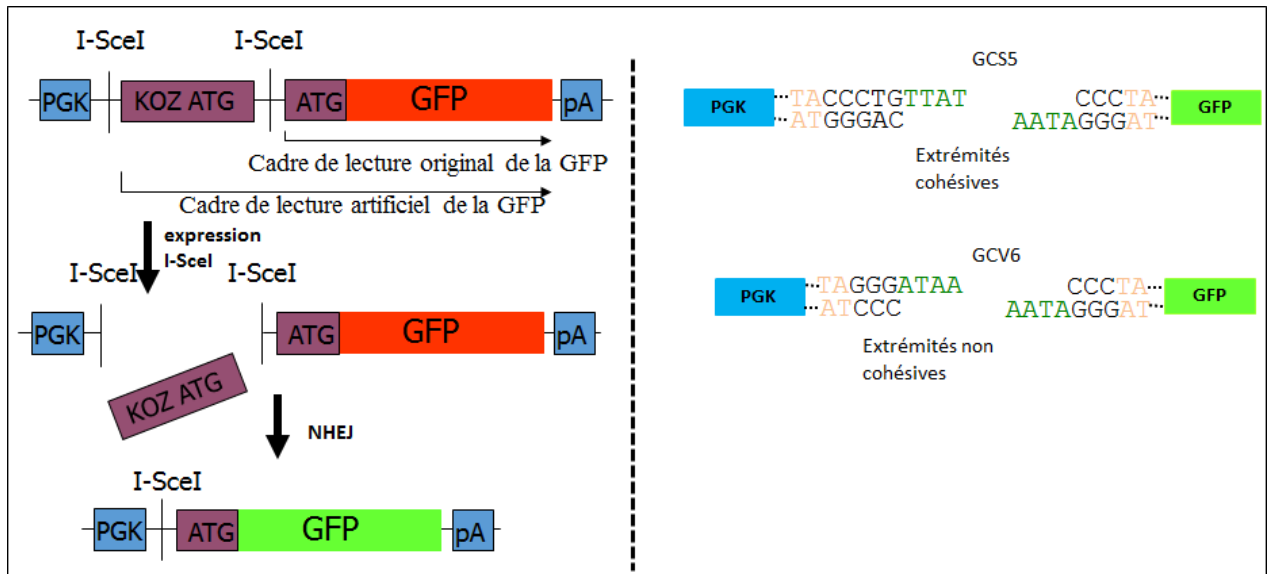
**Figure 14 :** Description des substrats rapporteurs de mesure du NHEJ présents dans les lignées cellulaires GC92 et GCSH14. Le premier substrat est composé de trois gènes codants pour les antigènes de surface H2kd, CD8 et CD4 qui ne sont pas présents dans ce type cellulaire. Le substrat contient également deux sites de restriction pour l'endonucléase I-SceI et seul le gène H2Kd s'exprime. Le gène CD8 ne s'exprime pas car il est cloné en sens inverse et le gène CD4 ne s'exprime pas car il est trop loin du promoteur, lorsque les cellules sont transfectées et expriment l'endonucléase I-SceI, la coupure peut engendrer la perte de la séquence entre les deux sites de restriction et la ligation des extrémités permet l'expression du gène CD4. Les événements CD4 sont détectés par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps. Le deuxième substrat rapporteur (présent dans la lignée GCSH14) est en grande partie similaire au précédent, il ne diffère que par le remplacement du gène CD4 par le gène de la GFP et la distance du gène de la GFP par rapport au site de coupure I-SceI est beaucoup plus courte.



**Figure 15 :** protocole pour l'analyse des séquences réparées autour du site I-SceI. Les cellules sont transfectées avec les différents siRNA, puis avec l'endonucléase I-SceI, après l'extraction de l'ADN génomique, la séquence autour du site de coupure I-SceI est amplifiée. Les produits de PCR sont clonés dans le plasmide pGEM-T, puis séquencés.

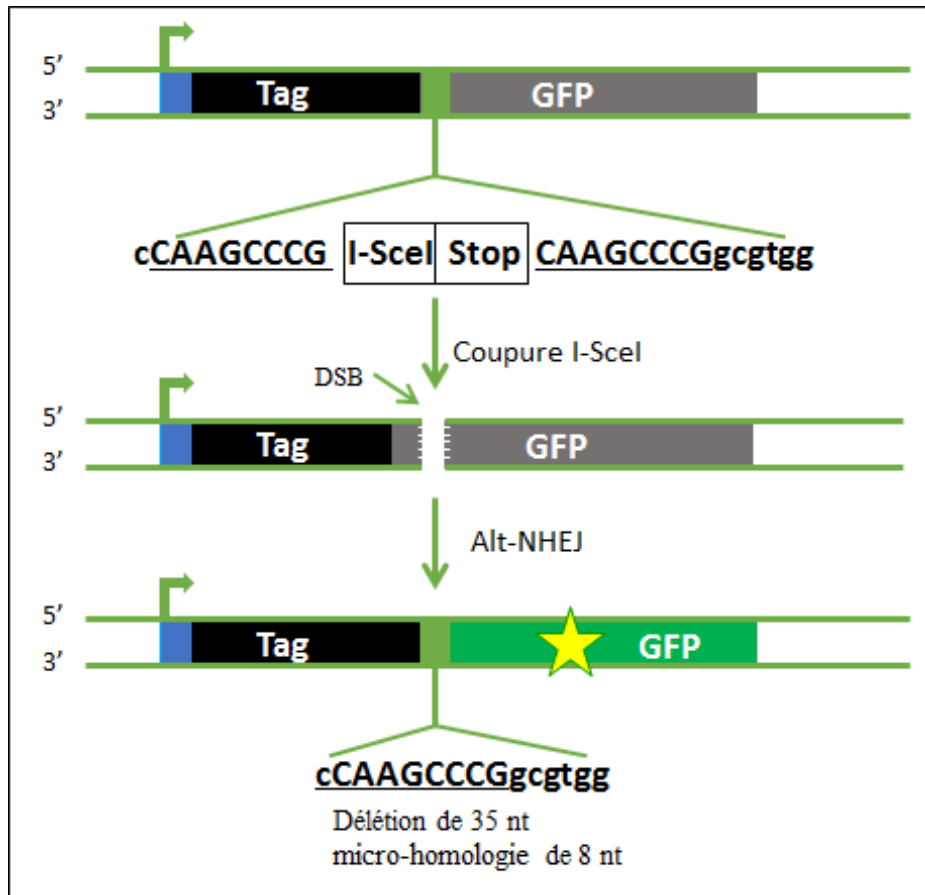


**Figure 16** : Description du substrat rapporteur pour la mesure des événements de réparation des DSBs par RH dans les fibroblastes RG37. Ce substrat est constitué de deux copies inactives du gène de la GFP. La première copie est inactive à cause de la présence du site de coupure pour l'endonucléase I-SceI et d'un codon stop. La deuxième copie est inactive parce qu'elle est tronquée au niveau des extrémités 5' et 3'. Lorsque les cellules sont transfectées et expriment I-SceI, la coupure peut engendrer la réparation par RH, la fréquence de tous les événements intra et inter brin est mesurée par cytométrie en flux.

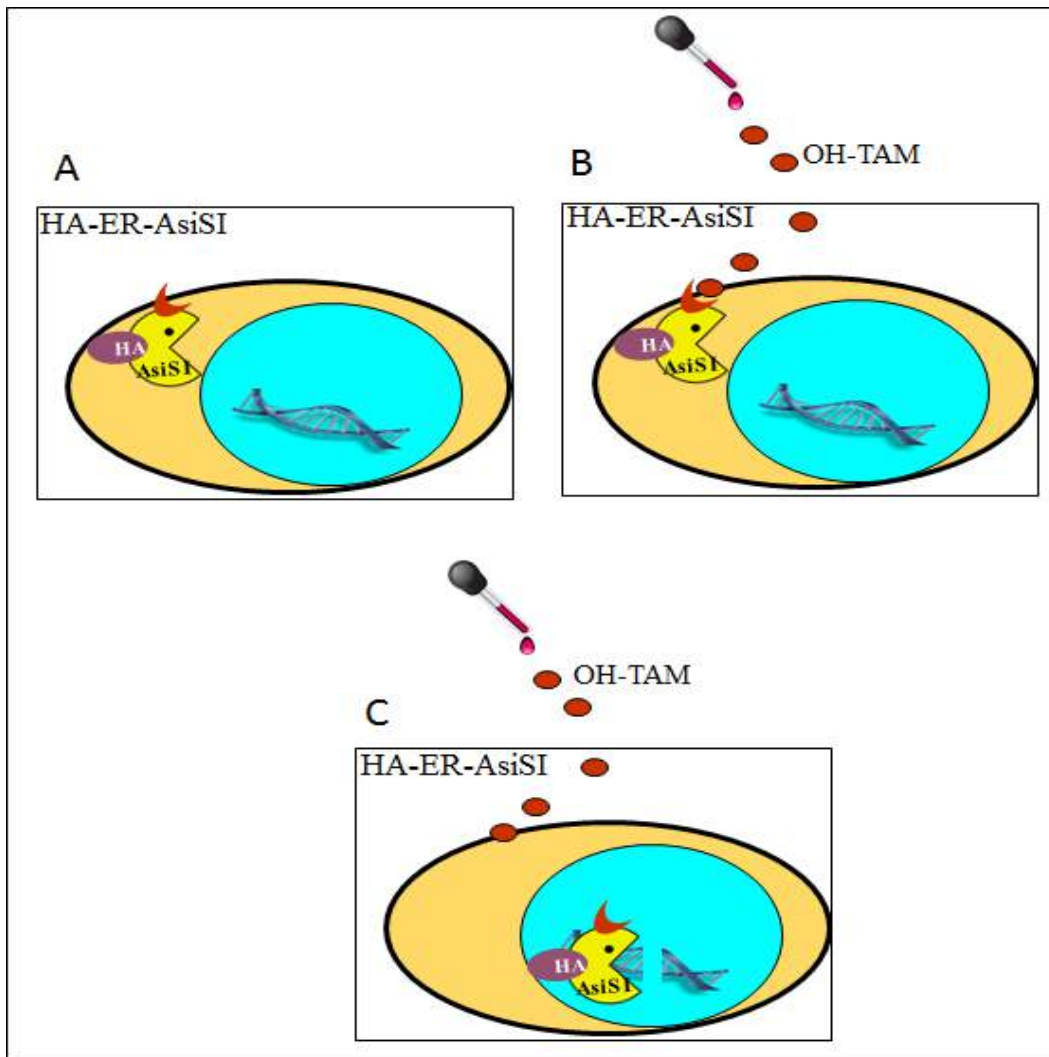


**Figure 17** : Description du substrat rapporteur de mesure des événements de réparation des DSBs par NHEJ dans les lignées GCS5 et GCV6. Le substrat rapporteur est constitué d'une copie inactive du gène de la GFP qui est la conséquence de la présence d'une séquence Kozak ATG qui décale le cadre de lecture du gène de la GFP. La séquence Koz ATG est bordée par deux sites de restriction pour l'endonucléase I-SceI, lorsque les cellules sont transfectées et exprime I-SceI, la coupure peut engendrer la perte de la séquence Koz ATG et la ligation des extrémités par NHEJ restaure le cadre de lecture du gène de la GFP qui peut alors s'exprimer. Les événements de réparation sont détectés et quantifiés par cytométrie en flux. Ce substrat permet de générer deux lignées cellulaires distinctes. Dans la première lignée cellulaire, les GCS5, les deux sites de restriction I-SceI sont clonés dans le même sens ce qui permet de générer des extrémités cohésives. La deuxième lignée cellulaire GCV6 contient un site de restriction I-SceI qui est cloné en sens inverse, ici le site situé du côté du promoteur. Ce qui permet de générer des extrémités non cohésives.

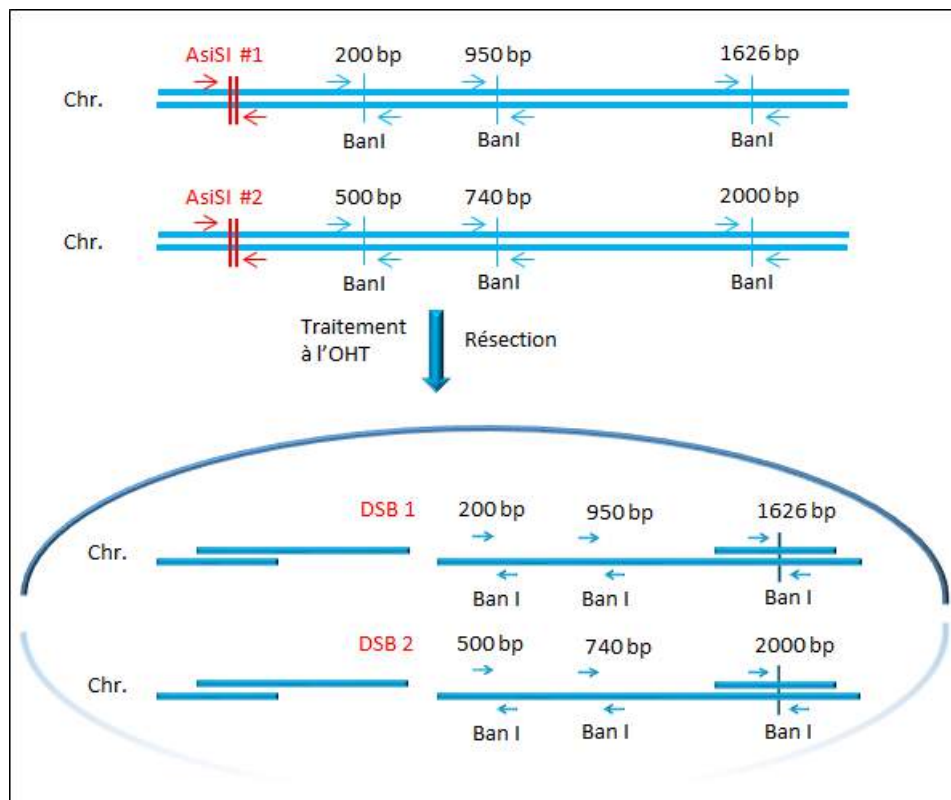




**Figure 18** : Description du substrat rapporteur qui permet de mesurer les événements de réparation des DSBs par NHEJ alternatif (lignée U2OS-EJ2). Ce substrat rapporteur est composé du gène de la GFP qui ne s'exprime pas à cause de la présence du site de coupure pour l'endonucléase I-SceI et d'un codon stop. Le substrat rapporteur contient également une microhomologie de huit nucléotides située de part et d'autre du site I-SceI. Lorsque les cellules sont transfectées et expriment l'endonucléase I-SceI, la coupure peut entraîner la réparation de la cassure par NHEJ alternatif, restaurer le gène de la GFP, le rendant ainsi actif, grâce à l'utilisation de la microhomologie. Les événements de réparation sont révélés par cytométrie en flux.



**Figure 19** : Description du système DIVA (DSB Induced via AsiSI - DivA). Ce système est présent dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome (U2OS) dans laquelle de multiples DSBs peuvent être induits à des endroits du génome identifiés. L'endonucléase AsiSI est fusionnée avec le récepteur aux oestrogènes muté pour fixer seulement l'Hydroxy tamoxifen (OH-TAM). (A) Dans les conditions normales de culture, l'enzyme AsiSI est séquestrée dans le cytoplasme des cellules. (B) Lorsqu'on rajoute l'OH-TAM dans le milieu de culture, celui-ci se fixe sur son récepteur. (C) l'OH-TAM permet au complexe enzymatique de pénétrer dans le noyau où l'enzyme induit des DSB.



**Figure 20** : Description du test de résection. Ce système est constitué de trois couples d'amorces situées à différentes distances du site de coupure par AsiSI. Suite à l'induction de la DSB par AsiSI, le processus de résection peut entraîner la perte des sites de restriction BanI présents aux alentours de la DSB car un seul des 2 brins est présent. Dans ce cas l'amplification par Q-PCR est possible. Toutefois, en absence de résection, les sites de restrictions BanI sont présents et pourront être clivés. Dans ce dernier cas de figure, l'amplification par Q-PCR des séquences spécifiques devient impossible.

### Le test de mutagénèse HPRT

#### GENOTYPE

#### PHENOTYPE

HPRT Sauvage	→	Sensibilité à la 6-thioguanine	→	Mort cellulaire
HPRT Muté	→	Résistance à la 6-thioguanine	→	survie cellulaire

HPRT: Hypoxantine phosphoribosyl transférase

**Figure 21** : test de mutagénèse HPRT. Lorsque le gène HPRT est sauvage, il peut catalyser la réaction de métabolisation de la 6-TG, qui devient toxique pour la cellule, en s'incorporant dans les brins d'ADN et d'ARN. Dans ce cas les cellules meurent et on n'obtient pas de clones. Par contre, lorsque le gène HPRT est muté (non fonctionnel), il ne peut pas catalyser la réaction de métabolisation de la 6-TG. Dans ce cas, les cellules survivent, prolifèrent et forment des clones

## V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, D.W., Ivanova, V.S., Wang, X., Bonner, W.M., and Ausio, J. (2001). Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation. *J Biol Chem* 276, 41945-41949.
- Acharya, S., Kaul, Z., Gocha, A.S., Martinez, A.R., Harris, J., Parvin, J.D., and Groden, J. (2014). Association of BLM and BRCA1 during Telomere Maintenance in ALT Cells. *PLoS one* 9, e103819.
- Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S.P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124, 301-313.
- Alatwi, H.E., and Downs, J.A. (2015). Removal of H2A.Z by INO80 promotes homologous recombination. *EMBO reports* 16, 986-994.
- Aly, A., and Ganesan, S. (2011). BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *Journal of molecular cell biology* 3, 66-74.
- Aravind, L., and Koonin, E.V. (2000). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci* 25, 112-114.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10148-10152.
- Ashour, M.E., Atteya, R., and El-Khamisy, S.F. (2015). Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. *Nature reviews. Cancer* 15, 137-151.
- Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 279, 55117-55126.
- Ausio, J. (2006). Histone variants--the structure behind the function. *Briefings in functional genomics & proteomics* 5, 228-243.
- Bao, Y., and Shen, X. (2007). INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes. *Mutat Res* 618, 18-29.
- Barnes, D.E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A., and Lindahl, T. (1998). Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Current biology* : CB 8, 1395-1398.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.

- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., and Stark, J.M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS genetics* *4*, e1000110.
- Bhoumik, A., Singha, N., O'Connell, M.J., and Ronai, Z.A. (2008). Regulation of TIP60 by ATF2 modulates ATM activation. *J Biol Chem* *283*, 17605-17614.
- Birchler, J.A., Bhadra, M.P., and Bhadra, U. (2000). Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. *Current opinion in genetics & development* *10*, 211-216.
- Boehler, C., Gauthier, L.R., Mortusewicz, O., Biard, D.S., Saliou, J.M., Bresson, A., Sanglier-Cianferani, S., Smith, S., Schreiber, V., Boussin, F., *et al.* (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 2783-2788.
- Bonisch, C., and Hake, S.B. (2012). Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic acids research* *40*, 10719-10741.
- Bothmer, A., Robbiani, D.F., Di Virgilio, M., Bunting, S.F., Klein, I.A., Feldhahn, N., Barlow, J., Chen, H.T., Bosque, D., Callen, E., *et al.* (2011). Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Mol Cell* *42*, 319-329.
- Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.E., Thompson, J.R., Chen, J., and Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* *127*, 1361-1373.
- Braun, K.A., Lao, Y., He, Z., Ingles, C.J., and Wold, M.S. (1997). Role of protein-protein interactions in the function of replication protein A (RPA): RPA modulates the activity of DNA polymerase alpha by multiple mechanisms. *Biochemistry* *36*, 8443-8454.
- Bryans, M., Valenzano, M.C., and Stamato, T.D. (1999). Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: evidence for stabilization by XRCC4. *Mutat Res* *433*, 53-58.
- Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., *et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* *141*, 243-254.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* *276*, 42462-42467.
- Cai, Y., Jin, J., Gottschalk, A.J., Yao, T., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (2006). Purification and assay of the human INO80 and SRCAP chromatin remodeling complexes. *Methods* *40*, 312-317.
- Campalans, A., Kortulewski, T., Amouroux, R., Menoni, H., Vermeulen, W., and Radicella, J.P. (2013). Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair. *Nucleic acids research* *41*, 3115-3129.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 729-740.

Campos, E.I., and Reinberg, D. (2009). Histones: annotating chromatin. *Annual review of genetics* 43, 559-599.

Cao, L., Xu, X., Bunting, S.F., Liu, J., Wang, R.H., Cao, L.L., Wu, J.J., Peng, T.N., Chen, J., Nussenzweig, A., *et al.* (2009). A selective requirement for 53BP1 in the biological response to genomic instability induced by Brca1 deficiency. *Mol Cell* 35, 534-541.

Capp, J.P., Boudsocq, F., Besnard, A.G., Lopez, B.S., Cazaux, C., Hoffmann, J.S., and Canitrot, Y. (2007). Involvement of DNA polymerase mu in the repair of a specific subset of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic acids research* 35, 3551-3560.

Caron, P., Aymard, F., Iacovoni, J.S., Briois, S., Canitrot, Y., Bugler, B., Massip, L., Losada, A., and Legube, G. (2012). Cohesin protects genes against gammaH2AX Induced by DNA double-strand breaks. *PLoS genetics* 8, e1002460.

Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A.D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in cell biology* 26, 52-64.

Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., *et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927.

Chan, H.M., Narita, M., Lowe, S.W., and Livingston, D.M. (2005). The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 --> p21 senescence pathway. *Genes & development* 19, 196-201.

Chapman, J.R., and Jackson, S.P. (2008). Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO reports* 9, 795-801.

Chen, H.T., Bhandoola, A., Difilippantonio, M.J., Zhu, J., Brown, M.J., Tai, X., Rogakou, E.P., Brotz, T.M., Bonner, W.M., Ried, T., *et al.* (2000). Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* 290, 1962-1965.

Chen, L., Cai, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (2011). Subunit organization of the human INO80 chromatin remodeling complex: an evolutionarily conserved core complex catalyzes ATP-dependent nucleosome remodeling. *J Biol Chem* 286, 11283-11289.

Chevillard-Briet, M., Quaranta, M., Grezy, A., Mattera, L., Courilleau, C., Philippe, M., Mercier, P., Corpet, D., Lough, J., Ueda, T., *et al.* (2014). Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling. *Human molecular genetics* 23, 2120-2131.

- Costantini, S., Woodbine, L., Andreoli, L., Jeggo, P.A., and Vindigni, A. (2007). Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair (Amst)* *6*, 712-722.
- Courilleau, C., Chailleux, C., Jauneau, A., Grimal, F., Briois, S., Boutet-Robinet, E., Boudsocq, F., Trouche, D., and Canitrot, Y. (2012). The chromatin remodeler p400 ATPase facilitates Rad51-mediated repair of DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology* *199*, 1067-1081.
- Couto, C.A., Wang, H.Y., Green, J.C., Kiely, R., Siddaway, R., Borer, C., Pears, C.J., and Lakin, N.D. (2011). PARP regulates nonhomologous end joining through retention of Ku at double-strand breaks. *The Journal of cell biology* *194*, 367-375.
- Cutter, A.R., and Hayes, J.J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS letters* *589*, 2914-2922.
- Dabin, J., Fortuny, A., and Polo, S.E. (2016). Epigenome Maintenance in Response to DNA Damage. *Mol Cell* *62*, 712-727.
- Dahlin, J.L., Chen, X., Walters, M.A., and Zhang, Z. (2015). Histone-modifying enzymes, histone modifications and histone chaperones in nucleosome assembly: Lessons learned from Rtt109 histone acetyltransferases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* *50*, 31-53.
- Dalvai, M., Loehr, J., Jacquet, K., Huard, C.C., Roques, C., Herst, P., Cote, J., and Doyon, Y. (2015). A Scalable Genome-Editing-Based Approach for Mapping Multiprotein Complexes in Human Cells. *Cell reports* *13*, 621-633.
- Dantzer, F., Menissier-de Murcia, J., Barlow, C., Wynshaw-Boris, A., and de Murcia, G. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase activity is not affected in ataxia telangiectasia cells and knockout mice. *Carcinogenesis* *20*, 177-180.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *Journal of molecular biology* *319*, 1097-1113.
- de Massy, B. (2013). Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annual review of genetics* *47*, 563-599.
- de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., *et al.* (1997). 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*, 7303-7307.
- De Rop, V., Padeganeh, A., and Maddox, P.S. (2012). CENP-A: the key player behind centromere identity, propagation, and kinetochore assembly. *Chromosoma* *121*, 527-538.
- De Vos, M., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochemical pharmacology* *84*, 137-146.



- Deng, C.X., and Scott, F. (2000). Role of the tumor suppressor gene *Brcal* in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene* *19*, 1059-1064.
- Dos Santos, P., Panero, J., Palau Nagore, V., Stanganelli, C., Bezares, R.F., and Slavutsky, I. (2015). Telomere shortening associated with increased genomic complexity in chronic lymphocytic leukemia. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* *36*, 8317-8324.
- Drouet, J., Delteil, C., Lefrancois, J., Concannon, P., Salles, B., and Calsou, P. (2005). DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* *280*, 7060-7069.
- Dryhurst, D., Ishibashi, T., Rose, K.L., Eirin-Lopez, J.M., McDonald, D., Silva-Moreno, B., Veldhoen, N., Helbing, C.C., Hendzel, M.J., Shabanowitz, J., *et al.* (2009). Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates. *BMC biology* *7*, 86.
- 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 research* *31*, 5526-5533.
- Elsasser, S.J., Huang, H., Lewis, P.W., Chin, J.W., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2012). DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature* *491*, 560-565.
- Endo, M., Kohashi, K., Yamamoto, H., Ishii, T., Yoshida, T., Matsunobu, T., Iwamoto, Y., and Oda, Y. (2013). Ossifying fibromyxoid tumor presenting EP400-PHF1 fusion gene. *Human pathology* *44*, 2603-2608.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* *434*, 917-921.
- Fazio, T.G., Huff, J.T., and Panning, B. (2008). An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* *134*, 162-174.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* *421*, 448-453.
- Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C., Huang, H., Landry, M.C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., *et al.* (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* *499*, 50-54.
- Frank, S.R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO reports* *4*, 575-580.
- Frit, P., Barboule, N., Yuan, Y., Gomez, D., and Calsou, P. (2014). Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA repair* *17*, 81-97.

Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W.S., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2001). The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell* 106, 297-307.

Gebre-Medhin, S., Nord, K.H., Moller, E., Mandahl, N., Magnusson, L., Nilsson, J., Jo, V.Y., Vult von Steyern, F., Brosjo, O., Larsson, O., *et al.* (2012). Recurrent rearrangement of the PHF1 gene in ossifying fibromyxoid tumors. *The American journal of pathology* 181, 1069-1077.

Gell, D., and Jackson, S.P. (1999). Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic acids research* 27, 3494-3502.

Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes & development* 21, 1869-1881.

Gevry, N., Hardy, S., Jacques, P.E., Laflamme, L., Svotelis, A., Robert, F., and Gaudreau, L. (2009). Histone H2A.Z is essential for estrogen receptor signaling. *Genes & development* 23, 1522-1533.

Ghezraoui, H., Piganeau, M., Renouf, B., Renaud, J.B., Sallmyr, A., Ruis, B., Oh, S., Tomkinson, A.E., Hendrickson, E.A., Giovannangeli, C., *et al.* (2014). Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol Cell* 55, 829-842.

Gospodinov, A., Vaissiere, T., Krastev, D.B., Legube, G., Anachkova, B., and Herceg, Z. (2011). Mammalian Ino80 mediates double-strand break repair through its role in DNA end strand resection. *Molecular and cellular biology* 31, 4735-4745.

Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., Germann, S.M., Bertrand, P., Hickson, I.D., and Lopez, B.S. (2013). A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell reports* 5, 21-28.

Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., and Jackson, S.P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes & development* 22, 2767-2772.

Grewal, S.I., and Elgin, S.C. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447, 399-406.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352.

Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384.

Gurard-Levin, Z.A., Quivy, J.P., and Almouzni, G. (2014). Histone chaperones: assisting histone traffic and nucleosome dynamics. *Annual review of biochemistry* 83, 487-517.

Gursoy-Yuzugullu, O., Ayrapetov, M.K., and Price, B.D. (2015). Histone chaperone Anp32e removes H2A.Z from DNA double-strand breaks and promotes nucleosome reorganization and DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 7507-7512.

Haince, J.F., McDonald, D., Rodrigue, A., Dery, U., Masson, J.Y., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2008). PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem* *283*, 1197-1208.

Hake, S.B., Garcia, B.A., Kauer, M., Baker, S.P., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Allis, C.D. (2005). Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 6344-6349.

Hakme, A., Wong, H.K., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2008). The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO reports* *9*, 1094-1100.

Hargreaves, D.C., and Crabtree, G.R. (2011). ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell research* *21*, 396-420.

Helleday, T. (2011). The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol* *5*, 387-393.

Heyer, W.D. (2004). Recombination: Holliday junction resolution and crossover formation. *Current biology : CB* *14*, R56-58.

Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine* *361*, 1475-1485.

Huk, A., Izak-Nau, E., El Yamani, N., Uggerud, H., Vadset, M., Zasonska, B., Duschl, A., and Dusinska, M. (2015). Impact of nanosilver on various DNA lesions and HPRT gene mutations - effects of charge and surface coating. *Particle and fibre toxicology* *12*, 25.

Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *The EMBO journal* *29*, 1446-1457.

Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* *102*, 463-473.

Iliakis, G., Murmann, T., and Soni, A. (2015). Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis* *793*, 166-175.

Iouzalén, N., Moreau, J., and Mechali, M. (1996). H2A.ZI, a new variant histone expressed during *Xenopus* early development exhibits several distinct features from the core histone H2A. *Nucleic acids research* *24*, 3947-3952.

- Jasin, M., and Haber, J.E. (2016). The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. *DNA repair* 44, 6-16.
- Jonsson, Z.O., Jha, S., Wohlschlegel, J.A., and Dutta, A. (2004). Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell* 16, 465-477.
- Kadoch, C., and Crabtree, G.R. (2015). Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics. *Science advances* 1, e1500447.
- Kalocsay, M., Hiller, N.J., and Jentsch, S. (2009). Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Mol Cell* 33, 335-343.
- Kim, J.A., Kruhlak, M., Dotiwala, F., Nussenzweig, A., and Haber, J.E. (2007). Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals. *The Journal of cell biology* 178, 209-218.
- King, B.S., Cooper, K.L., Liu, K.J., and Hudson, L.G. (2012). Poly(ADP-ribose) contributes to an association between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 287, 39824-39833.
- Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., and Rine, J. (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* 2, E131.
- Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 61, 212-238.
- Krishnakumar, R., and Kraus, W.L. (2010). The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell* 39, 8-24.
- Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., *et al.* (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* 12, 1565-1576.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Swanson, S.K., Glaser, R.L., Yates, J.R., 3rd, Abmayr, S.M., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* 306, 2084-2087.
- Kusumoto, R., Dawut, L., Marchetti, C., Wan Lee, J., Vindigni, A., Ramsden, D., and Bohr, V.A. (2008). Werner protein cooperates with the XRCC4-DNA ligase IV complex in end-processing. *Biochemistry* 47, 7548-7556.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.

- Lam, I., and Keeney, S. (2015). Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a016634.
- Latrick, C.M., Marek, M., Ouararhni, K., Papin, C., Stoll, I., Ignatyeva, M., Obri, A., Ennifar, E., Dimitrov, S., Romier, C., *et al.* (2016). Molecular basis and specificity of H2A.Z-H2B recognition and deposition by the histone chaperone YL1. *Nature structural & molecular biology* 23, 309-316.
- Lavin, M.F. (2004). The Mre11 complex and ATM: a two-way functional interaction in recognising and signaling DNA double strand breaks. *DNA repair* 3, 1515-1520.
- Lee, J.W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wang, Z., and Povirk, L.F. (2004). Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem* 279, 805-811.
- Lee, K., Lau, Z.Z., Meredith, C., and Park, J.H. (2012). Decrease of p400 ATPase complex and loss of H2A.Z within the p21 promoter occur in senescent IMR-90 human fibroblasts. *Mechanisms of ageing and development* 133, 686-694.
- Lemaitre, C., Grabarz, A., Tsouroula, K., Andronov, L., Furst, A., Pankotai, T., Heyer, V., Rogier, M., Attwood, K.M., Kessler, P., *et al.* (2014). Nuclear position dictates DNA repair pathway choice. *Genes & development* 28, 2450-2463.
- Liang, X., Shan, S., Pan, L., Zhao, J., Ranjan, A., Wang, F., Zhang, Z., Huang, Y., Feng, H., Wei, D., *et al.* (2016). Structural basis of H2A.Z recognition by SRCAP chromatin-remodeling subunit YL1. *Nature structural & molecular biology* 23, 317-323.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- Luger, K., Dechassa, M.L., and Tremethick, D.J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 436-447.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Luo, X., and Kraus, W.L. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes & development* 26, 417-432.
- Macher-Goeppinger, S., Bermejo, J.L., Schirmacher, P., Pahernik, S., Hohenfellner, M., and Roth, W. (2013). Senescence-associated protein p400 is a prognostic marker in renal cell carcinoma. *Oncology reports* 30, 2245-2253.
- Maeshima, K., Ide, S., Hibino, K., and Sasai, M. (2016). Liquid-like behavior of chromatin. *Current opinion in genetics & development* 37, 36-45.
- Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., and Nozaki, T. (2014). Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma* 123, 225-237.

Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M., Baudat, F., Rogakou, E.P., de Boer, P., Blanco-Rodriguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W.M., and Burgoyne, P.S. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nature genetics* 27, 271-276.

Mahaney, B.L., Hammel, M., Meek, K., Tainer, J.A., and Lees-Miller, S.P. (2013). XRCC4 and XLF form long helical protein filaments suitable for DNA end protection and alignment to facilitate DNA double strand break repair. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 91, 31-41.

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 research* 38, 6065-6077.

Matsuda, R., Hori, T., Kitamura, H., Takeuchi, K., Fukagawa, T., and Harata, M. (2010). Identification and characterization of the two isoforms of the vertebrate H2A.Z histone variant. *Nucleic acids research* 38, 4263-4273.

Mattera, L., Escaffit, F., Pillaire, M.J., Selves, J., Tyteca, S., Hoffmann, J.S., Gourraud, P.A., Chevillard-Briet, M., Cazaux, C., and Trouche, D. (2009). The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene* 28, 1506-1517.

Maze, I., Noh, K.M., Soshnev, A.A., and Allis, C.D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat Rev Genet* 15, 259-271.

McDowall, A.W., Smith, J.M., and Dubochet, J. (1986). Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes in situ. *The EMBO journal* 5, 1395-1402.

Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725-736.

Michl, J., Zimmer, J., and Tarsounas, M. (2016). Interplay between Fanconi anemia and homologous recombination pathways in genome integrity. *The EMBO journal* 35, 909-923.

Miller, K.M., Tjeertes, J.V., Coates, J., Legube, G., Polo, S.E., Britton, S., and Jackson, S.P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nature structural & molecular biology* 17, 1144-1151.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343-348.

Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H., Debernardi, A., Hery, P., Curtet, S., *et al.* (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes & development* 27, 1680-1692.

Morrison, C., Smith, G.C., Stingl, L., Jackson, S.P., Wagner, E.F., and Wang, Z.Q. (1997). Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis. *Nature genetics* 17, 479-482.

Moscariello, M., Wieloch, R., Kurosawa, A., Li, F., Adachi, N., Mladenov, E., and Iliakis, G. (2015). Role for Artemis nuclease in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks by alternative end joining. *DNA repair* 31, 29-40.

Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z.Q., and Herceg, Z. (2006). Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8, 91-99.

Natarajan, A.T., Berni, A., Marimuthu, K.M., and Palitti, F. (2008). The type and yield of ionising radiation induced chromosomal aberrations depend on the efficiency of different DSB repair pathways in mammalian cells. *Mutat Res* 642, 80-85.

Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes & development* 25, 350-362.

Nishibuchi, I., Suzuki, H., Kinomura, A., Sun, J., Liu, N.A., Horikoshi, Y., Shima, H., Kusakabe, M., Harata, M., Fukagawa, T., *et al.* (2014). Reorganization of damaged chromatin by the exchange of histone variant H2A.Z-2. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 89, 736-744.

Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T., and Kanemaki, M. (2009). An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nature methods* 6, 917-922.

Noren Hooten, N., Kompaniez, K., Barnes, J., Lohani, A., and Evans, M.K. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *J Biol Chem* 286, 44679-44690.

Northall, S.J., Ivancic-Bace, I., Soultanas, P., and Bolt, E.L. (2016). Remodeling and Control of Homologous Recombination by DNA Helicases and Translocases that Target Recombinases and Synapsis. *Genes* 7.

Obri, A., Ouararhni, K., Papin, C., Diebold, M.L., Padmanabhan, K., Marek, M., Stoll, I., Roy, L., Reilly, P.T., Mak, T.W., *et al.* (2014). ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature* 505, 648-653.

Ogiwara, H., Ui, A., Otsuka, A., Satoh, H., Yokomi, I., Nakajima, S., Yasui, A., Yokota, J., and Kohno, T. (2011). Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene* 30, 2135-2146.

Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281-300.

Papamichos-Chronakis, M., Watanabe, S., Rando, O.J., and Peterson, C.L. (2011). Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell* 144, 200-213.

- Park, J.H., Sun, X.J., and Roeder, R.G. (2010). The SANT domain of p400 ATPase represses acetyltransferase activity and coactivator function of TIP60 in basal p21 gene expression. *Molecular and cellular biology* *30*, 2750-2761.
- Park, Y.J., Dyer, P.N., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2004). A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J Biol Chem* *279*, 24274-24282.
- Patel, A.G., Sarkaria, J.N., and Kaufmann, S.H. (2011). Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 3406-3411.
- Pradhan, S.K., Su, T., Yen, L., Jacquet, K., Huang, C., Cote, J., Kurdistani, S.K., and Carey, M.F. (2016). EP400 Deposits H3.3 into Promoters and Enhancers during Gene Activation. *Mol Cell* *61*, 27-38.
- Prasad, R., Dyrkheeva, N., Williams, J., and Wilson, S.H. (2015). Mammalian Base Excision Repair: Functional Partnership between PARP-1 and APE1 in AP-Site Repair. *PloS one* *10*, e0124269.
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nature structural & molecular biology* *16*, 819-824.
- Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006). A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *J Biol Chem* *281*, 13861-13864.
- Robu, M., Shah, R.G., Petitclerc, N., Brind'Amour, J., Kandan-Kulangara, F., and Shah, G.M. (2013). Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 1658-1663.
- Rocha, P.P., Raviram, R., Fu, Y., Kim, J., Luo, V.M., Aljoufi, A., Swanzey, E., Pasquarella, A., Balestrini, A., Miraldi, E.R., *et al.* (2016). A Damage-Independent Role for 53BP1 that Impacts Break Order and Igh Architecture during Class Switch Recombination. *Cell reports* *16*, 48-55.
- Rogakou, E.P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y., and Bonner, W.M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* *275*, 9390-9395.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* *273*, 5858-5868.
- Ropars, V., Drevet, P., Legrand, P., Baconnais, S., Amram, J., Faure, G., Marquez, J.A., Pietrement, O., Guerois, R., Callebaut, I., *et al.* (2011). Structural characterization of filaments formed by human Xrcc4-Cernunnos/XLF complex involved in nonhomologous



DNA end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 12663-12668.

Roth, D.B. (2014). V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiology spectrum* *2*.

Ruhf, M.L., Braun, A., Papoulias, O., Tamkun, J.W., Randsholt, N., and Meister, M. (2001). The domino gene of *Drosophila* encodes novel members of the SWI2/SNF2 family of DNA-dependent ATPases, which contribute to the silencing of homeotic genes. *Development* *128*, 1429-1441.

Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Chrivia, J.C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* *45*, 5671-5677.

Rulten, S.L., Fisher, A.E., Robert, I., Zuma, M.C., Rouleau, M., Ju, L., Poirier, G., Reina-San-Martin, B., and Caldecott, K.W. (2011). PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Mol Cell* *41*, 33-45.

Samuelson, A.V., Narita, M., Chan, H.M., Jin, J., de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Narita, M., Fuchs, M., Livingston, D.M., and Lowe, S.W. (2005). p400 is required for E1A to promote apoptosis. *J Biol Chem* *280*, 21915-21923.

Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., and Smith, M.M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* *103*, 411-422.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* *419*, 407-411.

Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509-514.

Scully, R., and Xie, A. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res* *750*, 5-14.

Sharma, G.G., So, S., Gupta, A., Kumar, R., Cayrou, C., Avvakumov, N., Bhadra, U., Pandita, R.K., Porteus, M.H., Chen, D.J., *et al.* (2010). MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* *30*, 3582-3595.

Sharma, M.K., Imamichi, S., Fukuchi, M., Samarth, R.M., Tomita, M., and Matsumoto, Y. (2016). In cellulo phosphorylation of XRCC4 Ser320 by DNA-PK induced by DNA damage. *Journal of radiation research* *57*, 115-120.

Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., and Wu, C. (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* *406*, 541-544.

- Simsek, D., and Jasin, M. (2010). Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nature structural & molecular biology* *17*, 410-416.
- Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E., and Jeggo, P.A. (1999). The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Molecular and cellular biology* *19*, 3267-3277.
- Smeenk, G., and Mailand, N. (2016). Writers, Readers, and Erasers of Histone Ubiquitylation in DNA Double-Strand Break Repair. *Frontiers in genetics* *7*, 122.
- Smeenk, G., and van Attikum, H. (2013). The chromatin response to DNA breaks: leaving a mark on genome integrity. *Annual review of biochemistry* *82*, 55-80.
- Smith, J.A., White, E.A., Sowa, M.E., Powell, M.L., Ottinger, M., Harper, J.W., and Howley, P.M. (2010). Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 3752-3757.
- Smith, S., and Stillman, B. (1991). Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro. *The EMBO journal* *10*, 971-980.
- Soni, A., Siemann, M., Grabos, M., Murmann, T., Pantelias, G.E., and Iliakis, G. (2014). Requirement for Parp-1 and DNA ligases 1 or 3 but not of Xrcc1 in chromosomal translocation formation by backup end joining. *Nucleic acids research* *42*, 6380-6392.
- Soni, A., Siemann, M., Pantelias, G.E., and Iliakis, G. (2015). Marked contribution of alternative end-joining to chromosome-translocation-formation by stochastically induced DNA double-strand-breaks in G2-phase human cells. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis* *793*, 2-8.
- Spagnolo, L., Barbeau, J., Curtin, N.J., Morris, E.P., and Pearl, L.H. (2012). Visualization of a DNA-PK/PARP1 complex. *Nucleic acids research* *40*, 4168-4177.
- Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* *421*, 961-966.
- Stracker, T.H., and Petrini, J.H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature reviews. Molecular cell biology* *12*, 90-103.
- Strom, C.E., Johansson, F., Uhlen, M., Szgyarto, C.A., Erixon, K., and Helleday, T. (2011). Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic acids research* *39*, 3166-3175.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* *123*, 1213-1226.
- Subramanian, V., Mazumder, A., Surface, L.E., Butty, V.L., Fields, P.A., Alwan, A., Torrey, L., Thai, K.K., Levine, S.S., Bathe, M., *et al.* (2013). H2A.Z acidic patch couples chromatin

- dynamics to regulation of gene expression programs during ESC differentiation. *PLoS genetics* *9*, e1003725.
- Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstine, J.R., and Price, B.D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol* *11*, 1376-1382.
- Sutcliffe, E.L., Parish, I.A., He, Y.Q., Juelich, T., Tierney, M.L., Rangasamy, D., Milburn, P.J., Parish, C.R., Tremethick, D.J., and Rao, S. (2009). Dynamic histone variant exchange accompanies gene induction in T cells. *Molecular and cellular biology* *29*, 1972-1986.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* *7*, 1121-1124.
- Tamaru, H. (2010). Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes & development* *24*, 1465-1478.
- Tamburini, B.A., and Tyler, J.K. (2005). Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Molecular and cellular biology* *25*, 4903-4913.
- Tang, J., Cho, N.W., Cui, G., Manion, E.M., Shanbhag, N.M., Botuyan, M.V., Mer, G., and Greenberg, R.a. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nature structural & molecular biology* *20*, 317-325.
- Tang, L., Nogales, E., and Ciferri, C. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Progress in biophysics and molecular biology* *102*, 122-128.
- Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S.R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2004). E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Molecular and cellular biology* *24*, 4546-4556.
- Tham, K.C., Kanaar, R., and Lebbink, J.H. (2016). Mismatch repair and homeologous recombination. *DNA repair* *38*, 75-83.
- Thompson, L.H., and Schild, D. (2002). Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* *509*, 49-78.
- Tong, W.M., Cortes, U., Hande, M.P., Ohgaki, H., Cavalli, L.R., Lansdorp, P.M., Haddad, B.R., and Wang, Z.Q. (2002). Synergistic role of Ku80 and poly(ADP-ribose) polymerase in suppressing chromosomal aberrations and liver cancer formation. *Cancer research* *62*, 6990-6996.
- Tremethick, D.J. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* *128*, 651-654.

- 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 research* 26, 2644-2649.
- Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J.A., and Osley, M.A. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 438, 379-383.
- Tworkowski, K.A., Chakraborty, A.A., Samuelson, A.V., Seger, Y.R., Narita, M., Hannon, G.J., Lowe, S.W., and Tansey, W.P. (2008). Adenovirus E1A targets p400 to induce the cellular oncoprotein Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6103-6108.
- Tyteca, S., Vandromme, M., Legube, G., Chevillard-Briet, M., and Trouche, D. (2006). Tip60 and p400 are both required for UV-induced apoptosis but play antagonistic roles in cell cycle progression. *The EMBO journal* 25, 1680-1689.
- Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Ogawa, H., Fukuyama, H., Higashi, Y., Nagata, S., and Fukunaga, R. (2007). Critical role of the p400/mDomino chromatin-remodeling ATPase in embryonic hematopoiesis. *Genes Cells* 12, 581-592.
- van Attikum, H., Fritsch, O., and Gasser, S.M. (2007). Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks. *The EMBO journal* 26, 4113-4125.
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and Gasser, S.M. (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* 119, 777-788.
- Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12871-12876.
- Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412, 607-614.
- Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B.A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S.P., and Elledge, S.J. (2007). Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* 316, 1194-1198.
- Wang, H., Perrault, A.R., Takeda, Y., Qin, W., Wang, H., and Iliakis, G. (2003). Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic acids research* 31, 5377-5388.
- Ward, I.M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276, 47759-47762.
- Ward, I.M., Minn, K., van Deursen, J., and Chen, J. (2003). p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Mol Cell Biol* 23, 2556-2563.

Wen, H., Li, Y., Xi, Y., Jiang, S., Stratton, S., Peng, D., Tanaka, K., Ren, Y., Xia, Z., Wu, J., *et al.* (2014). ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression. *Nature* 508, 263-268.

Weterings, E., Verkaik, N.S., Bruggenwirth, H.T., Hoeijmakers, J.H., and van Gent, D.C. (2003). The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic acids research* 31, 7238-7246.

Weterings, E., Verkaik, N.S., Keijzers, G., Florea, B.I., Wang, S.Y., Ortega, L.G., Uematsu, N., Chen, D.J., and van Gent, D.C. (2009). The Ku80 carboxy terminus stimulates joining and artemis-mediated processing of DNA ends. *Molecular and cellular biology* 29, 1134-1142.

Wong, M.M., Cox, L.K., and Chrivia, J.C. (2007). The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters. *J Biol Chem* 282, 26132-26139.

Woodcock, C.L., and Ghosh, R.P. (2010). Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000596.

Wu, L., and Hickson, I.D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 426, 870-874.

Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S.H., Fabrizio, L.A., Erdjument-Bromage, H., Ishibe-Murakami, S., Wang, B., Tempst, P., Hofmann, K., *et al.* (2009). WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* 457, 57-62.

Xie, A., Kwok, A., and Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nature structural & molecular biology* 16, 814-818.

Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y., and Price, B.D. (2012). Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 48, 723-733.

Xu, Y., Sun, Y., Jiang, X., Ayrapetov, M.K., Moskwa, P., Yang, S., Weinstock, D.M., and Price, B.D. (2010). The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. *The Journal of cell biology* 191, 31-43.

Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., *et al.* (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478-482.

Yang, H.D., Kim, P.J., Eun, J.W., Shen, Q., Kim, H.S., Shin, W.C., Ahn, Y.M., Park, W.S., Lee, J.Y., and Nam, S.W. (2016). Oncogenic potential of histone-variant H2A.Z.1 and its regulatory role in cell cycle and epithelial-mesenchymal transition in liver cancer. *Oncotarget* 7, 11412-11423.

Yang, Y.G., Cortes, U., Patnaik, S., Jasin, M., and Wang, Z.Q. (2004). Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. *Oncogene* 23, 3872-3882.

Ying, S., Hamdy, F.C., and Helleday, T. (2012). Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer research* 72, 2814-2821.

Young, A.P., Schlisio, S., Minamishima, Y.A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., Signoretti, S., and Kaelin, W.G., Jr. (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol* 10, 361-369.

Yuan, J., Adamski, R., and Chen, J. (2010). Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. *FEBS letters* 584, 3717-3724.

Yun, M.H., and Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* 459, 460-463.

## SUMMARY

The human genome is constantly targeted by DNA damaging agents. These damages are many and varied, such as single and double strand breaks (DSBs). The DSB are highly toxic lesions whose origin can be multiple. Mammalian cells mainly use two DNA repair pathways to repair DSB, homologous recombination (RH), which is dependent on the presence of the intact homologous copy (the sister chromatid) and on the cell cycle stage and the non-homologous end joining (NHEJ) pathway, which is cell cycle independent and performs direct ligation of the two DNA ends. The repair of DNA damage takes place in a chromatin context that needs to be remodeled to give access to damaged sites. During my work, I studied the chromatin remodeler p400 and the histone variant H2A.Z both involved in chromatin remodeling, to understand their role in DSB repair and genome stability. p400, an ATPase of the SWI2/SNF2 family is involved in the incorporation of H2A.Z in chromatin. I have shown that H2A.Z depletion in the osteosarcoma cell line U2OS and in immortalized human fibroblasts did not alter DSB repair. These results are correlated with the lack of H2A.Z recruitment at DSB observed after local laser irradiation or Chromatin Immunoprecipitation. However, H2A.Z depletion affects cell proliferation and the cell cycle distribution. In addition, I have shown that the chromatin remodeler p400 is a brake to the use of alternative End Joining (alt-EJ) which is a highly mutagenic repair process. The increase in alt-EJ events observed in p400-depleted cells is dependent on CtIP-mediated resection of DNA ends. Moreover, p400 depletion leads to the recruitment of poly(ADP) ribose polymerase (PARP) and DNA ligase 3 at DSB, leading to selective cell killing by PARP inhibitors. Altogether these results show that p400 acts as a brake to prevent alt-EJ dependent genetic instability and underline its potential value as a clinical marker.

Key words: chromatin, H2A.Z, p400, DNA repair, Epigenetics, Cancer.

## RESUME

Le génome humain est constamment la cible d'agents qui endommagent l'ADN. Ces dommages sont multiples et variés tels que les cassures simple et double brin (DSB). Les DSBs sont des lésions très toxiques dont l'origine peut être multiple. Les cellules de mammifères réparent les DSBs en utilisant deux mécanismes principaux, la recombinaison homologe (RH) qui est dépendante du cycle cellulaire et utilise la chromatide sœur comme matrice de réparation et la jonction des extrémités non homologues (NHEJ) qui est indépendante du cycle cellulaire et consiste en la ligation des extrémités d'ADN endommagées. Cette réparation a lieu dans un contexte chromatinien qui nécessite un dynamisme pour rendre accessible les sites lésés aux différentes machineries de réparation. Lors de mes travaux, j'ai étudié le remodeleur de la chromatine p400 ainsi que le variant d'histone H2A.Z qui sont deux protéines impliquées dans la dynamique de la chromatine, afin de comprendre leur rôle dans les mécanismes de réparation des DSBs et la stabilité du génome. p400, une ATPase de la famille SWI2/SNF2 participe à l'incorporation du variant d'histone H2A.Z dans la chromatine. Au cours de ma thèse, j'ai montré que la déplétion par siRNA du variant d'histone H2A.Z, dans la lignée d'ostéosarcome humain (U2OS) et dans des fibroblastes humains immortalisés, n'a pas d'effets sur la réparation des DSBs. Ces résultats sont corrélés avec une absence de recrutement de H2A.Z au niveau des cassures après étude par micro irradiation laser ou par immunoprécipitation de chromatine. Cependant, la déplétion de H2A.Z affecte la prolifération cellulaire en influençant l'efficacité de clonage et le cycle cellulaire. L'autre partie de mes travaux a mis en évidence que l'ATPase p400 est un frein à l'utilisation de la voie alternative de jonction des extrémités (alt-EJ) qui est un processus de réparation des DSBs très mutagène. L'augmentation des événements du NHEJ-Alternatif et la génération d'instabilité génétique observés lors de la déplétion de p400 par siRNA semblent tributaires de la résection des DSBs par CtIP. Ces résultats indiquent que p400 joue un rôle post-résection dans les étapes plus tardives de la RH. De plus, la déplétion de p400 conduit au recrutement de la polyADP ribose polymérase (PARP) et de l'ADN ligase 3 à la DSB, ce qui provoque la mort sélective de ces cellules lors d'un traitement par des inhibiteurs de PARP. Ces résultats montrent que P400 agit comme un frein pour empêcher l'utilisation du NHEJ-Alternatif et donc l'instabilité génétique.

Mots clés: chromatine, H2A.Z, p400, réparation de l'ADN, épigénétique, Cancer