



HAL
open science

Rôle du médiateur et des cohésines dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN

Emilie Lebraud

► **To cite this version:**

Emilie Lebraud. Rôle du médiateur et des cohésines dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS407 . tel-02117109

HAL Id: tel-02117109

<https://theses.hal.science/tel-02117109>

Submitted on 2 May 2019

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.

Rôle du médiateur et des cohésines dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN

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

École doctorale n°577 Structure et dynamique des systèmes vivants
(SDSV)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 19 octobre 2018, par

Mme Emilie Lebraud

Composition du Jury :

Mme Julie Soutourina Chercheur CEA, Université Paris-Sud (I2BC)	Présidente
M. Bertrand Castaing Directeur de recherche, CNRS (CBM)	Rapporteur
M. Sébastien Huet Maître de Conférences, Université de Rennes 1 (IGDR)	Rapporteur
Mme Gaëlle Legube Directrice de recherche, Université de Toulouse (LBCMCP)	Examinatrice
Mme Anna Campalans Chercheur CEA, Université Paris-Sud (IRCM)	Directrice de thèse

Rôle du médiateur et des cohésines dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN

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

École doctorale n°577 Structure et dynamique des systèmes vivants
(SDSV)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 19 octobre 2018, par

Mme Emilie Lebraud

Composition du Jury :

Mme Julie Soutourina Chercheur CEA, Université Paris-Sud (I2BC)	Présidente
M. Bertrand Castaing Directeur de recherche, CNRS (CBM)	Rapporteur
M. Sébastien Huet Maître de Conférences, Université de Rennes 1 (IGDR)	Rapporteur
Mme Gaëlle Legube Directrice de recherche, Université de Toulouse (LBCMCP)	Examinatrice
Mme Anna Campalans Chercheur CEA, Université Paris-Sud (IRCM)	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury : les rapporteurs Dr. Sébastien Huet et Dr. Bertrand Castaing, ainsi que les examinatrices Dr. Julie Soutourina et Dr. Gaëlle Legube, d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Merci également aux Dr. Evi Soutoglou et Dr. Philippe Herbomel, membres de mon comité de thèse, pour leur implication et leurs précieux conseils au cours de ma thèse.

Mes remerciements vont ensuite au Dr. Pablo Radicella, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et qui m'a fait confiance lors d'une période particulièrement difficile, voilà presque 3 ans. Aujourd'hui encore je me dis que ma vie aurait pu être bien différente sans ton accueil. Donc encore un très grand merci !

C'est avec une très grande émotion que je souhaite ensuite remercier ma directrice de thèse, le Dr. Anna Campalans. J'aurai beaucoup de mal à trouver les mots à la hauteur de mon ressenti en cette fin de thèse. Merci pour ta patience (même quand je fais tomber des gels dans le siphon de l'évier...), tes connaissances, ta gentillesse et ta disponibilité quotidiennes, ton enthousiasme, tes encouragements, ta passion débordante pour la science. Tu as été un véritable point de repère pour moi pendant ces 3 années. Tu es et tu resteras toujours un vrai modèle, que ce soit personnellement ou professionnellement. J'envie déjà les futurs thésards que tu vas encadrer. J'espère de tout cœur pouvoir retravailler avec toi un jour. Ne change jamais !

Merci à tous les membres de mon labo, Chantal Desmaze et Debora Lia (la team OGG1 !!), Anne Bravard et Jacqueline Bernardino (la team Prion !!), Prashant Damke et Anne-Marie Di Guilmi (la team Pylori !!), pour leur bonne humeur au quotidien, leurs conseils et leur soutien. Jack je ne pourrais pas oublier de sitôt tes fous rires au milieu du labo qui résonnent jusqu'au bout du couloir. Anne, je penserai toute ma vie à toi en éteignant le bain marie le vendredi soir... ! Merci aux filles du labo pour nos soirées « entre girls ». Capucine (dans toutes les teams !!), merci pour toute ton aide avec la bioch. C'était tellement agréable de travailler avec toi, le labo a une chance inestimable de t'avoir ! Merci également à Christophe Carles, « ex membre » du LRIG, pour tes discussions passionnées sur le piano et tes conseils scientifiques. Enfin je suis obligée de finir ce paragraphe par ma petite Anne-Marie... Qu'elle chance j'ai eu de te rencontrer... Une vraie belle rencontre. Merci pour ces deux dernières années de colocation, nos conversations sur tout et sur rien, ton soutien moral quotidien, tes corrections de manuscrit, ton amitié, ta couture, tes confitures, tes sauces tomates... Vivement l'année prochaine pour tes conseils de poterie. J'espère qu'un jour tu me raconteras tes folles expériences de Pylori pour induire le recrutement d'OGG1.

Un grand merci également à tous les membres du CIGEx, Didier Busso, Xavier Veaute, Jordane Dépagne et Eléa Dizet. Ce projet de thèse n'aurait jamais aussi bien avancé sans vous. Didier et Xavier, merci pour tous les déjeuners animés, c'était une réelle bouffée d'oxygène dans ma journée. Xavier je te promets qu'un jour je me mettrai à utiliser Illustrator. Jordane, merci pour ton immense investissement dans ce projet, pour ton enthousiasme, pour tes histoires

de voyage et ta joie de vivre. Enfin ce projet n'aurait jamais vu le jour sans la contribution de Guillaume Pinna, que je remercie donc chaleureusement. Merci aussi pour tous tes conseils en statistiques, ton aide a été plus que précieuse.

Merci aux thésards de l'institut, tout particulièrement Hélène Bordelet et Anna Lioutsko, avec qui j'ai commencé cette folle aventure de thèse. Ma petite Hélène, stay strong and keep faith ! Tu vas faire une superbe thèse j'en suis sûre (si si je t'assure !). Je suis déçue de ne pas pouvoir assister à la fin mais je serai toujours dans les parages... Merci pour tous les moments qu'on a partagés, au CEA et en dehors, et pour les futurs ! Cette thèse n'aurait pas du tout été la même sans toi. Anna, ma future belle-sœur, je te souhaite le meilleur évidemment. Qui aurait cru en débutant cette thèse que l'on partagerait notre repas de Noël en famille ?! Merci aussi à Thomas Guérin, pour tes conseils de vieux thésard expérimenté, pour tes expériences un peu douteuses avec la carboglace et la découverte de la terrasse au 3^{ème} étage.

Un merci un peu spécial à Françoise Hoffschir, ma « co-encadrante » de début de thèse. Ta bienveillance et tes conseils m'ont été précieux. Je n'oublierai jamais nos premières manip sur les macrophages et les fibroblastes, en testant 40 conditions en parallèle et 10 marquages de mitochondries. Les mois passés à travailler ensemble ont vraiment été super. Je te souhaite le meilleur pour cette « nouvelle » vie à la retraite, entourée de tes petits-enfants. Un grand merci aussi à Anne-Sophie Gallouet, qui a accepté d'être dans mon jury de thèse de pharmacie. Ta bonne humeur débordante était un vrai plaisir. Merci à Lamy pour tes connaissances en microscopie, ta précieuse aide pour régler tous les bugs, ta patience en période de crise et de stress.

Je remercie également François-Xavier L'Ecuyer, mon mari, qui a vécu avec moi ces trois années de thèse et qui m'a toujours soutenu. Merci pour ta patience, ton écoute et ton aide avec Word ! Dans les bons comme dans les mauvais jours, tu es toujours présent. Je remercie aussi bien sûr mes parents, qui m'ont toujours encouragé durant mes études et ce projet de thèse, et qui ont toujours cru en moi. Ils ont été et seront toujours une source d'inspiration et des exemples pour moi. Une pensée spéciale pour ma maman, que j'aurais tant aimé avoir avec moi ces dernières années. Un grand merci aussi à ma grande sœur, qui même en tant loin a toujours été présente pour moi. Merci aussi à mes beaux-parents et beaux-grand-parents, qui m'ont toujours soutenu. Merci Papère pour tes petits déjeuners avant de commencer mes journées de rédaction.

Je souhaite enfin remercier mes amies, Rim, Mathilde, Astrid, Marie, Clotilde, Glawdys, Clémentine. Vous avez quasiment vécu cette thèse aussi, donc merci pour votre présence dans les bons comme les mauvais moments, votre soutien et votre bonne humeur. Heureusement que nos soirées et week-ends entre filles étaient là pour me faire souffler. Mathilde et Rim, mes chéries, merci pour tout, particulièrement pendant la période de préparation du mariage en 1^{ère} année de thèse. Je serais perdue sans vous ! Enfin, je remercie mes collègues pharmaciennes, thésards, et amies, Charlène Faye et Clémence Duddefant pour leur aide tout au long de la thèse (des concours au mémoire), les conseils pratiques et leur soutien en toute occasion.

Table des matières

Remerciements	3
Liste des figures et des tableaux	9
Liste des abréviations	11
Avant-propos	15
INTRODUCTION	17
Chapitre I – Le stress oxydatif	19
I. Définition et origine du stress oxydatif.....	19
1. Sources endogènes.....	19
a. L’anion superoxyde $O_2^{\circ-}$	20
b. Le peroxyde d’hydrogène H_2O_2	20
c. Le radical hydroxyle OH°	21
2. Sources exogènes.....	21
II. Les défenses anti-oxydantes	21
1. Défenses anti-oxydantes enzymatiques	22
2. Défenses anti-oxydantes non enzymatiques :	22
III. Cibles biologiques du stress oxydatif	23
1. Effets sur les lipides.....	23
2. Effets sur les protéines.....	23
3. Effets sur l’ADN.....	23
IV. Pathologies liées au stress oxydatif	25
Chapitre II : Les mécanismes de réparation de l’ADN	27
I. La réparation par excision de base.....	27
1. Mécanisme global du BER.....	27
2. Initiation de la réparation : pour chaque lésion une ADN glycosylase spécifique	28
3. Mécanismes de réparation de la 8-oxoguanine.....	30
a. La 8-oxoguanine, une lésion particulière	30
b. Découverte, structure et mécanisme d’action d’OGG1.....	34
c. Modifications post-traductionnelles d’OGG1	36
d. Pathologies associées à la réparation de la 8-oxoguanine	37
4. Clivage du site abasique	38
5. La protéine plateforme XRCC1	39
II. La réparation des cassures simple brin de l’ADN.....	41
III. La réparation par excision de nucléotides	42
IV. La réparation des cassures double brin de l’ADN	45
V. Conclusion générale du chapitre II	47
Chapitre III - Organisation nucléaire	49
I. Organisation de l’ADN	49
1. Les degrés de compaction de l’ADN.....	49
2. Les histones	50
a. Structure des histones.....	50
b. Variants d’histones.....	51
c. Modifications post-traductionnelles des histones	52
d. Dynamique des histones et réparation.....	53
i. Historique des modèles de remodelage de la chromatine.....	53
ii. Mobilité des histones et réparation.....	55
iii. Remodeleurs de la chromatine et réparation	55
3. Organisation du noyau en domaines d’hétérochromatine et d’euchromatine.....	57
a. Notions d’hétérochromatine et d’euchromatine	57
b. Organisation chromatinienne de la réparation de l’ADN.....	59

II.	Organisation du noyau en domaines sub-nucléaires	59
1.	Le nucléole	61
2.	Les corps de Cajal	62
3.	Les corps PML	62
4.	Les speckles et paraspeckles	63
5.	Autres corps nucléaires.....	64
III.	Conclusion générale du chapitre III.....	65
Chapitre IV – Le complexe des cohésines		67
I.	Les complexes SMC	67
1.	Historique de la découverte des complexes SMC	67
2.	Architecture des complexes SMC	68
a.	Le complexe des cohésines	68
b.	Les complexes des condensines	69
c.	Le complexe SMC5-6	69
3.	Distinction entre cohésines et condensines	70
II.	Régulation des cohésines	71
1.	Capture de l'ADN et dissociation des cohésines.....	71
a.	Cycle de chargement et de dissociation des cohésines en phase G1.....	72
b.	Etablissement de la cohésion	74
c.	Mécanismes de dissolution de la cohésion.....	75
2.	Translocation des complexes.....	76
III.	Rôles physiologiques des complexes SMC	77
1.	Le rôle des cohésines dans la méiose	78
2.	Cohésines et régulation de l'expression de gènes	79
a.	Les cohésines facilitent l'activation de la transcription	80
b.	Cohésines et CTCF	81
3.	Cohésines et intégrité du génome.....	83
a.	La réplication	83
b.	La réparation des cassures double brin de l'ADN.....	83
IV.	Pathologies humaines	86
1.	Cohésinopathies.....	86
2.	Autres syndromes multi-systèmes	87
3.	Anomalies chromosomiques et fertilité.....	88
4.	Cohésines et cancer	88
V.	Conclusion générale du chapitre IV.....	89
Chapitre V - Le Médiateur de la transcription		91
I.	La transcription	91
1.	Les acteurs de la transcription	91
a.	Le promoteur et les séquences régulatrices.....	91
b.	L'ARN polymérase II	92
c.	Les facteurs généraux.....	93
d.	Les facteurs spécifiques de la transcription.....	93
e.	Les co-activateurs de la transcription.....	94
2.	Formation du complexe de pré-initiation	95
3.	Régulation de l'élongation	98
II.	Le Médiateur de la transcription.....	98
1.	Composition et structure.....	98
a.	Structure globale du Médiateur	98
b.	Le module CDK8	100
c.	Le Médiateur: une structure dynamique.....	100
2.	Fonctions du Médiateur	101

a.	Le Médiateur et la transcription	101
i.	Médiateur et assemblage du complexe de pré-initiation	101
ii.	Médiateur et initiation de la transcription par l'ARN Pol II.....	102
iii.	Médiateur et élongation de la transcription par l'ARN Pol II	102
iv.	Le rôle particulier du module CDK.....	103
b.	Autres fonctions du Médiateur.....	104
i.	Médiateur et architecture de la chromatine	104
ii.	Médiateur et réparation.....	105
3.	Le Médiateur et les voies de signalisation.....	106
III.	Pathologies humaines liées au Médiateur.....	107
IV.	Conclusion générale du chapitre V.....	108
Objectifs	109
RESULTATS	111
I.	Historique du projet de recherche	112
II.	Quelles protéines influencent le recrutement d'OGG1 ?	112
III.	Peut-on généraliser les effets observés ?	116
1.	Rôles du Médiateur suite à un stress oxydatif induit par H ₂ O ₂	116
2.	Rôle du Médiateur et des cohésines sur la relocalisation d'autres enzymes du BER..	117
a.	Rôle du Médiateur et des cohésines sur la relocalisation d'autres ADN glycosylases 117	
b.	Rôle du Médiateur et des cohésines sur le recrutement de XRCC1.....	119
IV.	Le rôle des cohésines et du Médiateur est-il dépendant du cycle cellulaire ?	120
V.	Quels sont les effets de l'absence du Médiateur sur l'excision de la 8-oxo-G ?.....	122
1.	Cinétique de réparation de la 8-oxoG.....	122
2.	Rôle du Médiateur sur la cinétique de réparation de la 8-oxoG	124
VI.	Quelle est la dynamique des complexes Médiateur et cohésines en réponse au stress oxydatif?.....	126
1.	Dynamique d'OGG1 et des complexes Médiateur et cohésines en fonction du stress	126
2.	Dynamique de CTCF en fonction du stress oxydatif	129
3.	Rôles du Médiateur et des cohésines sur la dynamique des sous-unités du module CDK 130	
4.	Association d'OGG1 avec les complexes Médiateur et cohésines induite par le stress oxydatif.....	132
5.	Rôle et dynamique des sous-unités paralogues du module CDK du Médiateur.....	134
6.	Rôle de l'activité kinase sur le recrutement d'OGG1/CDK8 et la réparation de la 8- oxoG	138
VII.	Résultats complémentaires	140
1.	Dynamique d'OGG1 et de CDK8 après micro-irradiation laser	140
2.	Modification post-traductionnelle des cohésines après induction de dommages oxydatifs.....	141
3.	Suivi de la transcription globale après exposition au stress oxydatif	142
4.	Recherche de nouveaux acteurs impliqués dans le recrutement d'OGG1.....	143
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	147
Matériel et méthodes	161
Annexes	173
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	177

Liste des figures et des tableaux

Introduction

Figure I.1 : Production des intermédiaires réduits de l'oxygène par la chaîne respiratoire mitochondriale.

Figure I.2 : Principaux oxydants endogènes.

Figure I.3 : Collaboration des principales enzymes anti-oxydantes.

Figure I.4 : Différents types de lésions provoquées par les espèces réactives de l'oxygène.

Tableau I.1 : Types de lésions endogènes retrouvées dans l'ADN.

Figure II.1 : Mécanismes de réparation par excision de base.

Tableau II.1 : Liste des ADN glycosylases chez les mammifères.

Figure II.2 : Structure de la 8-oxoG et de ses appariements possibles.

Figure II.3 : Mécanisme de formation des mutations induites par la 8-oxodGTP.

Figure II.4 : Système GO mammifère.

Figure II.5 : Complexe de reconnaissance de la 8-oxoG par OGG1.

Figure II.6 : Représentation schématique des différents domaines de XRCC1.

Figure II.7 : Mécanismes de réparation des cassures simple brin.

Figure II.8 : Mécanisme général de la réparation par excision de nucléotide.

Figure II.9 : Mécanismes de réparation des cassures double brin.

Figure III.1 : Les différents degrés de compaction de la chromatine.

Figure III.2 : Modifications connues des histones.

Figure III.3 : Modèle « Accès-Initiation-Réparation-Restauration ».

Figure III.4 : Morphologie d'un noyau cellulaire de mammifère.

Tableau III.1 : Caractéristiques des principaux corps nucléaires.

Figure III.5 : Représentation schématique des principaux domaines sub-nucléaires.

Figure IV.1 : Architecture des complexes SMC.

Figure IV.2 : Rôles des cohésines et des condensines dans la formation des chromosomes mitotiques.

Figure IV.3 : Dynamique des cohésines à travers le cycle cellulaire chez les vertébrés.

Figure IV.4 : Modèles d'entrée et de sortie de l'ADN du complexe cohésines.

Figure IV.5 : Régulation de la présence des cohésines aux centromères pendant la prophase.

Figure IV.6 : Rôle des cohésines pendant la méiose I.

Figure IV.7 : Lien physique et fonctionnel entre les cohésines et le Médiateur de la transcription.

Figure IV.8 : Formation d'une boucle d'ADN grâce aux cohésines et aux motifs CTCF.

Figure IV.9 : Fonctions des cohésines dans la réparation de l'ADN.

Tableau IV.1 : Liste des gènes dont les mutations peuvent causer un syndrome de Cornelia de Lange.

Figure V.1 : Principaux effets des activateurs sur les étapes de la transcription.

Tableau V.1 : Principaux co-activateurs chez les eucaryotes.

Figure V.2 : Etapes de l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II.

Figure V.3 : Composition du complexe du Médiateur de la transcription.

Figure V.4 : Structure et organisation du Médiateur chez l'homme et la levure.

Figure V.5 : Fonctions du Médiateur dans les premières étapes de la transcription.

Figure V.6 : Rôle du Médiateur dans l'architecture de la chromatine.

Figure V.7 : Principales fonctions du Médiateur.

Résultats

Figure 1 : Principe du crible siRNA à haut débit.

Figure 2 : La relocalisation d'OGG1 sur la chromatine est dépendante des complexes Médiateur et cohésines.

Figure 3 : La relocalisation d'OGG1 sur la chromatine est dépendante de la présence des sous-unités du module CDK.

Figure 4 : La relocalisation d'OGG1 sur la chromatine induite par H₂O₂ dépend du Médiateur.

Figure 5 : Le Médiateur et les cohésines sont nécessaires à la relocalisation de plusieurs ADN glycosylases sur la chromatine.

Figure 6 : La relocalisation d'OGG1 et de XRCC1 est dépendante des cohésines et du Médiateur.

Figure 7 : Le Médiateur et les cohésines sont nécessaires au recrutement d'OGG1 tout au long du cycle cellulaire.

Figure 8 : La cinétique de réparation de la 8-oxoG par trois approches différentes.

Figure 9 : L'activité enzymatique d'OGG1 n'est pas affectée par l'absence de sous-unités du Médiateur ou des cohésines.

Figure 10 : La réparation de la 8-oxoG nécessite la présence du Médiateur.

Figure 11 : OGG1, le Médiateur et les cohésines ont des dynamiques différentes en fonction du stress.

Figure 12 : OGG1, MED12 et CDK8 co-localisent sur la chromatine après un stress oxydatif.

Figure 13 : OGG1 et CTCF possèdent des localisations différentes dans des cellules exposées au stress oxydatif.

Figure 14 : Le recrutement de MED12 et CDK8 sur la fraction chromatiniennne induit par le stress oxydant est dépendant du corps du Médiateur et des cohésines.

Figure 15 : OGG1, le Médiateur et les cohésines s'associent après un stress oxydatif.

Figure 16 : Proximité sub-nucléaire entre OGG1 et CDK8 après leur relocalisation sur la chromatine induite par un stress oxydatif.

Figure 17 : La relocalisation d'OGG1 sur la chromatine dépend des sous-unités paralogueues du module CDK.

Figure 18 : CDK19 et MED12L sont co-recrutées et co-localisées avec OGG1 sur la chromatine après stress oxydatif.

Figure 19 : Le recrutement d'OGG1 sur la chromatine et la réparation de la 8-oxoG ne nécessitent pas l'activité enzymatique des kinases CDK8/CDK19.

Figure 20 : OGG1 et CDK8 sont recrutées aux dommages oxydatifs induits par micro-irradiation laser.

Figure 21 : Le traitement par KBrO₃ induit une phosphorylation de la sérine 966 de la sous-unité SMC1 des cohésines.

Figure 22 : Le recrutement d'OGG1 sur la chromatine est corrélé à une diminution globale de la transcription.

Figure 23 : Partenaires d'OGG1 identifiés par la technique de BioID.

Discussion

Figure 1 : Modèle des rôles respectifs des complexes Médiateur, cohésines et du facteur CTCF sur la relocalisation d'OGG1 sur la chromatine en réponse à stress oxydatif.

Liste des abréviations

8-oxodGTP: 8-oxoguanine triphosphate
8-oxoG: 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxy-Guanine
aARN: ncARN activateur
AE : Alkaline Elution
AMS: Atrophie Musculaire Spinale
APC/C: Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
APE1: AP-Endonuclease 1
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP: Adénosine TriPhosphate
ATR: ATM-Rad3-related
BER: Base Excision Repair
BirA: Biotine ligase modifiée
BRCA1/2: Breast Cancer-Associated protein 1/2
BRCT1/2: BRCA1 Carboxyl-Terminal protein interaction domain 1/2
CA: Cortistatin A
CDB: Cassure Double Brin
CDK: Cyclin-Dependent Kinase
CDLS: Syndrome de Cornelia de Lange
CF: Centre Fibrillaire
CFD: Composant Fibrillaire Dense
CG: Composant Granulaire
ChIP-seq: Chromatin Immunoprecipitation – sequencing
CN: Corps Nucléaire
CPI: Complexe de Pré-Initiation
CSA/B: Cockayne Syndrome protein A/B
CTCF: CCCTC- binding factor
CTD: C-Terminal Domain
CyC: Cycline C
DDR: DNA Damage Response
dRP: deoxyRibose Phosphate
DSIF: DRB Sensitivity-Inducing Factor
EB: Extrusion de Boucle
EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène
ES cell: Cellule souche embryonnaire

ESCO1/2: Establishment of Sister Chromatid Cohesion N-actéyltransférase 1/2
EU: 5-ethynyl-uridine
FACT: FAcilitates Chromatin Transcription
Fapy: Formamidopyrimidine
FEB: Facteur d'Extrusion de Boucle
FEN-1: 5'-Flap Endonuclease 1
FGT: Facteurs Généraux de la Transcription
FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FRET: Förster Resonance Energy Transfer
FST: Facteurs Spécifiques de la Transcription
GG-NER: Global Genome-NER
HAT: Histone AcétylTransférase
HDAC: Histone Désacétylase
HhH: Helix-hairpin Helix
HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor-1 alpha
HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à haute Performance
KBrO₃: Bromate de potassium
KO: Knock-Out
KRAB: Kruppel-Associated Box
LDL: Low-Density-Lipoproteins
MEF: Mouse Embryonic Fibroblast
MPT: Modification Post-Traductionnelle
NADP: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBD: Nucleotidic Binding Domain
ncARN: ARN non codant
NELF: Negative transcription Elongation Factor
NER: Nucleotide Excision repair
NF κ B: Nuclear Factor kappa B
NHEJ: Non Homologous End Joining
NOR: Nucleolus Organizer Regions
NTD: N-Terminal Domain
OGG1: 8-oxoguanine DNA-Glycosylase 1
OG-seq : 8-oxo-7,8-dihydroguanine-sequencing
PALM: PhotoActivated Localization Microscopy
PARG: Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase
PARP-1: Poly(ADP-ribose) Polymerase 1
PAXX: PARalog of XRCC4 and XLF

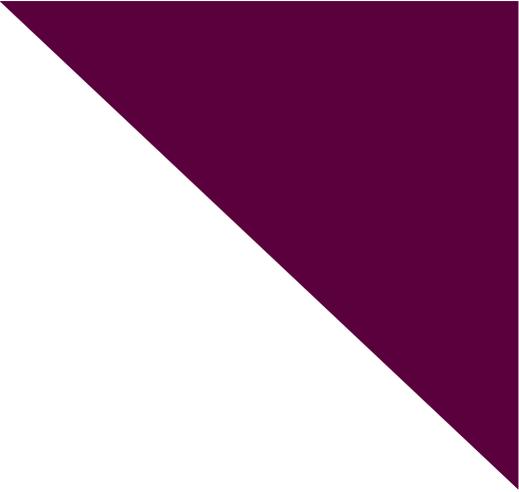
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PKC: Protein Kinase C
PML: ProMyelocytic Leukaemia
PNK: PolyNucleotide Kinase
Pol: Polymérase
PP2A: Protein Phosphatase 2
P-TEFb: Positive Transcription Elongation Factor b
RH: Recombinaison Homologue
RPA: Replication Protein A
S326C: Sérine-326-Cystéine
SE: Super Elongation (complexe)
Sgo1: Shugosin 1
SiCont : SiContrôle
Site AP: Site abasique apurinique ou apyrimidique
SMC: Structural Maintenance of Chromosomes
snARN: small nuclear ARN
snoARN: small nucleolar ARN
snRNP: small nuclear ribonucleoprotein
SOD: Superoxy Dismutase
SPT: Single Particle Tracking
SR: Syndrome de Roberts
SSBR: Single-Strand Break Repair
STORM: Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
TAD: Topologically Associating Domain
TAF: TBP-Associated Factor
TBP: TATA-Binding Protein
TC-NER: Transcription-Coupled NER
Tg: Thymine glycol
TGF β : Transforming Growth Factor β
Top1: Topoisomérase 1
USP7: Ubiquitin-Specific-Processing protease 7
UTR: Untranslated regions
UVSSA: UV-Stimulated Scaffold protein A
XLF: XRCC4-Like Factor
XPA/B/C/D/G: Xeroderma Pigmentosum complementation group A/B/C/D/G
XRCC1/4: X-ray Repair Cross-Complementing protein 1/4

Avant-propos

Le maintien de la stabilité génétique est une fonction cellulaire essentielle. Les composants cellulaires sont constamment exposés au stress oxydatif, provenant à la fois de notre environnement, tels que les agents chimiques ou les radiations ionisantes, et du métabolisme cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène produites par ce stress induisent, entre autres dommages, de nombreuses lésions dans la molécule d'ADN, telles que l'oxydation des bases, la formation de sites abasiques ou la cassure de brins d'ADN. En évitant ou en limitant l'impact de ces dommages, les systèmes de réparation de l'ADN jouent un rôle critique dans la survie cellulaire et dans la prévention de pathologies telles que les maladies neurodégénératives ou le cancer.

Le système de réparation par excision de bases (BER) est la principale voie utilisée par les cellules pour réparer les bases modifiées ou les sites abasiques, mécanisme conservé des bactéries aux cellules humaines. Il a été constaté que des « usines de réparation BER » se forment suite à des traitements générant des bases oxydées dans l'ADN cellulaire. Ces complexes incluent les enzymes essentielles du BER (l'ADN glycosylase, l'AP endonucléase, la polymérase β et la ligase 3) ainsi que la protéine d'échafaudage qui coordonne le processus, XRCC1. Dans le cas de la lésion mutagène 8-oxoguanine (8-oxoG), l'assemblage du complexe BER et l'initiation de la réparation dépendent du recrutement à la chromatine d'OGG1, l'ADN glycosylase qui reconnaît et excise la lésion. Cependant, le recrutement d'OGG1 ne nécessite pas la reconnaissance de la lésion. En effet, une forme mutante d'OGG1 ayant perdu l'affinité pour la base oxydée est efficacement recrutée à la chromatine en réponse au stress oxydatif. Cela implique qu'il existe d'autres signaux que la reconnaissance de la base modifiée par OGG1 qui permettent le recrutement de l'enzyme à la chromatine, et ainsi l'initiation de la réparation de la 8-oxoG.

Afin d'identifier les protéines nécessaires au recrutement d'OGG1, un crible à haut débit a été réalisé dans des cellules humaines. Parmi les candidats issus de ce crible, deux catégories de protéines ont été sélectionnées : les membres du complexe du Médiateur de la transcription et les sous-unités des cohésines. L'objectif de ce projet de recherche est donc d'analyser plus précisément le rôle du Médiateur et des cohésines dans le recrutement d'OGG1 suite à un stress oxydatif. Il a récemment été montré que les cohésines et le Médiateur interviennent dans d'autres voies de réparation de l'ADN, les cassures doubles brins et les lésions induites par UV respectivement. Cependant jusqu'à aujourd'hui, aucun lien direct n'avait été établi entre les protéines du BER, le Médiateur, et les cohésines. L'identification des mécanismes moléculaires ainsi que de nouveaux facteurs impliqués dans la réparation des bases oxydées pourraient être utilisés dans la conception de nouvelles thérapies. Elle pourrait notamment fournir des indications pour le choix d'agents chimio-thérapeutiques qui optimiseraient les réponses des cellules tumorales aux dommages de l'ADN. A long terme, nos travaux pourraient donc contribuer à établir les fondements théoriques pour l'amélioration du pronostic et de la prise en charge thérapeutique du cancer.



INTRODUCTION

Chapitre I – Le stress oxydatif

La molécule d'oxygène est indispensable à la vie, mais est également susceptible de générer une toxicité, via la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Chez les organismes aérobies, et dans des conditions physiologiques normales, l'excès d'ERO est éliminé grâce aux défenses anti-oxydantes de notre organisme, qui s'assurent de maintenir le taux d'oxydants nécessaire au fonctionnement de la cellule. Les ERO peuvent entraîner des dommages de l'ADN, mais également des lipides et des protéines. Si l'organisme n'est pas capable de maintenir l'équilibre entre production et élimination des ERO, des mécanismes doivent alors se mettre en place pour éliminer les dommages cellulaires engendrés (Palipoch and Koomhin, 2015). Ce premier chapitre a pour objectif de décrire de façon non-exhaustive les sources d'ERO et de défenses anti-oxydantes, les cibles cellulaires des ERO et leur rôle dans certaines pathologies.

I. Définition et origine du stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme une altération de l'équilibre entre la production d'ERO et les défenses anti-oxydantes, ce qui favorise l'apparition de dommages cellulaires au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides suite à une production excessive d'ERO (Sies et al., 2017). Les sources d'ERO peuvent être endogènes ou exogènes.

1. Sources endogènes

Les ERO sont toutes produites à partir de la molécule d'oxygène (O_2) au cours du métabolisme cellulaire normal. Les principales sources endogènes d'ERO ont été identifiées dans la mitochondrie, au niveau de la chaîne de transport des électrons. Les sources non-mitochondriales proviennent des réactions de Fenton, du complexe enzymatique du cytochrome P450, de l'oxydation des peroxysomes, et des cellules phagocytaires (neutrophiles, macrophages) (Pisoschi and Pop, 2015). Les ERO peuvent être classés en deux groupes : les radicaux libres, ou espèces radicalaires, et les espèces non radicalaires. Les radicaux libres possèdent un électron libre, tandis que les espèces non radicalaires sont des molécules chimiquement stables (Sies et al., 2017). Les radicaux libres sont principalement l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le radical hydroxyle (OH°), et le radical peroxyde (ROO°). Les espèces non radicalaires quant à elles sont majoritairement le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le lipoperoxyde ($ROOH$), l'oxygène singulet (1O_2), et l'ozone (O_3) (Sies et al., 2017). Parmi ces ERO, les trois composants majeurs impliqués dans le fonctionnement de la cellule sont l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène (Birben et al., 2012).

a. L'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$

L'anion superoxyde est formé par l'addition d'un électron à la molécule d'oxygène. Ce processus fait intervenir la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) oxydase (Figure I.2), la xanthine oxydase, ou le système mitochondrial de transport des électrons (Figure I.1) (Birben et al., 2012). La mitochondrie reste cependant le principal site de production de l'anion superoxyde. En effet, dans la mitochondrie les électrons sont transportés à travers la chaîne respiratoire générant un gradient de protons utilisé pour la production d'ATP (Figure I.1). Cependant entre 1 et 3% des électrons peuvent échapper au système et produire l'anion superoxyde (Ramsden et al., 2012).

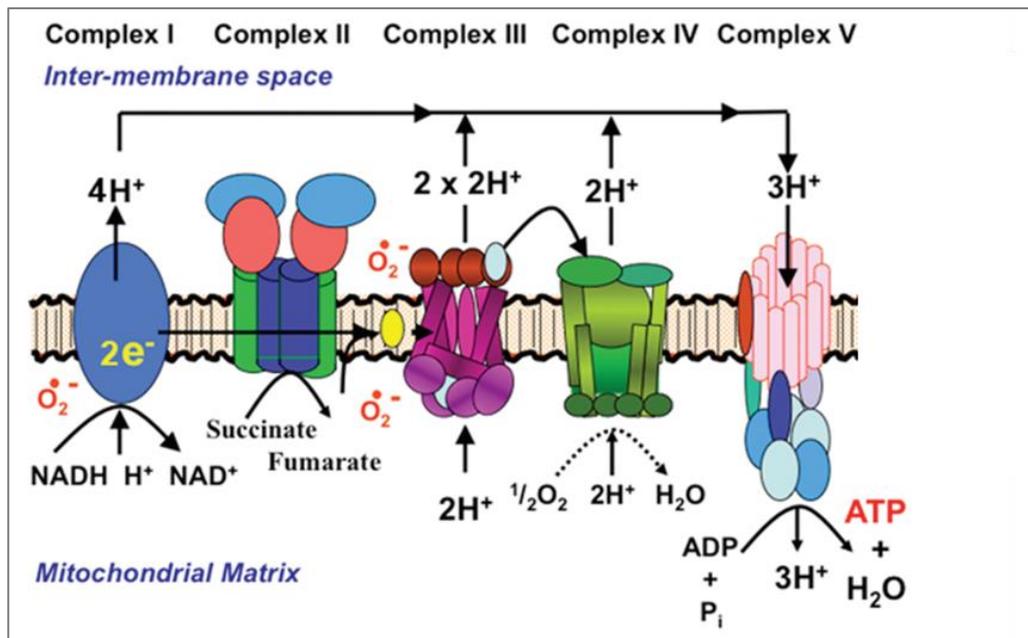
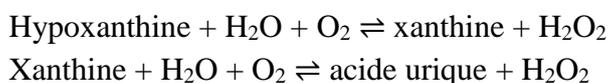


Figure I.1 : Production des intermédiaires réduits de l'oxygène par la chaîne respiratoire mitochondriale. La phosphorylation oxydative mitochondriale permet la production d'énergie sous forme d'ATP. Les complexes I, II, III et IV interviennent dans le transport des électrons et le complexe V dans la synthèse de l'ATP. Une minorité des électrons produits peut s'échapper de la chaîne respiratoire et entraîner la formation d'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) (Adapté d'après Ramsden et al., 2012).

b. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

La dismutation de l'anion superoxyde par des superoxyde dismutases (SOD) permet de convertir l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Figure I.2) (Pisoschi and Pop, 2015). Le peroxyde d'hydrogène peut donc être produit par n'importe quel système générant l'anion superoxyde. Cette espèce non radicalaire peut également être produite par différentes oxydases (NADPH, xanthine, hypoxanthine), principalement dans les peroxysomes, en présence d'oxygène et d'eau selon les réactions suivantes :



c. Le radical hydroxyle OH°

Le peroxyde d'hydrogène peut à son tour produire d'autres radicaux libres en présence de métaux tels que le Fe²⁺ ou le Cu²⁺, grâce à la réaction de Fenton (Figure I.2) (Birben et al., 2012). Le radical hydroxyle est une espèce radicalaire très agressive, responsable des dommages oxydatifs de la plupart des molécules. Ce radical peut provenir de la réaction de Fenton décrite juste avant, ou de la radiolyse de l'eau. OH° est le radical oxydant le plus puissant, qui peut directement interagir avec ses cibles (ADN, lipides, protéines, acides aminés, sucres et métaux) au niveau du site où il est généré étant donné sa durée de vie très courte (Pisoschi and Pop, 2015).

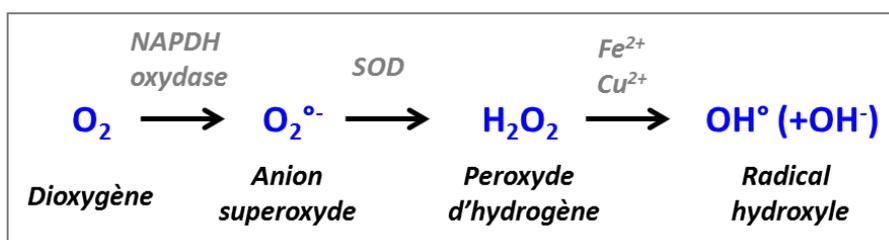


Figure I.2 : Principaux oxydants endogènes. Une molécule d'oxygène peut progressivement entrer dans des étapes de réduction, générant des intermédiaires réduits, ou espèces réactives de l'oxygène. NAPD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate. SOD : Superoxyde Dismutase (Adapté d'après Pisoschi and Pop, 2015).

2. Sources exogènes

Les sources exogènes d'ERO sont nombreuses, et nous sommes continuellement exposés à des espèces oxydantes, radicalaires ou non, présentes dans notre environnement. Les principales sources exogènes sont la consommation d'alcool, la fumée de cigarette, la pollution ou encore les radiations ionisantes (Palipoch and Koomhin, 2015). La fumée de cigarette contient de nombreux oxydants et radicaux libres, tels que le monoxyde et le dioxyde d'azote (Church and Pryor, 1985). De plus, l'inhalation de fumée de cigarette dans les poumons active des mécanismes endogènes tels que l'accumulation de neutrophiles et de macrophages, augmentant encore les dommages dus aux oxydants. Les radiations ionisantes, en présence d'O₂, peuvent convertir le radical hydroxyle ou l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Birben et al., 2012).

II. Les défenses anti-oxydantes

L'organisme dispose d'un ensemble de défenses anti-oxydantes pour se protéger des effets nocifs des ERO. Les défenses anti-oxydantes peuvent être de deux types : enzymatiques et non enzymatiques (Haleng et al., 2007).

1. Défenses anti-oxydantes enzymatiques

Les trois principales enzymes capables de défendre l'organisme contre le stress oxydatif sont les superoxydes dismutases (SOD), la catalase, et la glutathion peroxydase. Les SOD peuvent transformer l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Il existe trois types de SOD dans les tissus des mammifères : la SOD1, présente dans le cytosol, la SOD2, retrouvée dans la matrice mitochondriale, et la SOD3, extracellulaire, est sécrétée par les cellules musculaires lisses (Haleng et al., 2007; Pisoschi and Pop, 2015). Les trois enzymes sont fortement exprimées, particulièrement dans les tubes rénaux (Sung et al., 2013). La catalase est l'enzyme capable de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau. Elle est exprimée dans la majorité des tissus et des organes, majoritairement dans le foie et les érythrocytes (Sung et al., 2013). La dernière défense contre les ERO, particulièrement le peroxyde d'hydrogène, est la glutathion peroxydase. Cette enzyme qui contient du sélénium permet entre autres de réduire la molécule de peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau. Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) qui peut exister sous forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG). Le glutathion réduit fonctionne comme un donneur d'électron pour la glutathion peroxydase (Haleng et al., 2007). Le glutathion réduit peut ensuite être renouvelé par la NADPH oxydase (Dröge, 2002). Le fonctionnement collaboratif de ces trois enzymes est représenté dans la figure I.3.

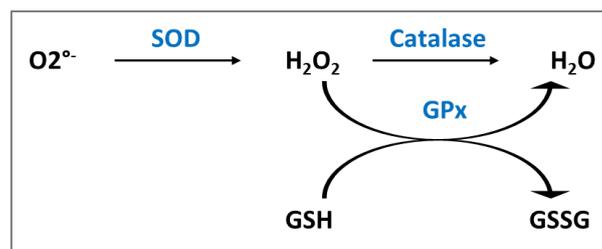


Figure I.3 : Collaboration des principales enzymes anti-oxydantes. Les superoxydes dismutases (SOD) permettent de réduire l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène peut à son tour être réduit en molécule d'eau (H_2O) sous l'action de la catalase ou de la glutathion peroxydase (GPx) (Adapté d'après Dröge, 2002).

2. Défenses anti-oxydantes non enzymatiques

Les anti-oxydants endogènes non enzymatiques sont nombreux. Par exemple, l'acide urique, le majeur produit du métabolisme des purines, est un puissant piègeur de radicaux libres, dont l'oxygène singulet ou les radicaux hydroxyle/peroxyde. Il protège également contre la peroxydation des lipides (Pisoschi and Pop, 2015). Son action entraîne la formation d'autres radicaux libres, à leur tour pris en charge par des défenses anti-oxydantes telles que la vitamine C (Haleng et al., 2007). A titre d'exemple, on peut également citer la bilirubine, capable de piéger le radical peroxyde ou l'oxygène singulet, ou encore le coenzyme Q réduit, qui piège l'anion superoxyde produit par la chaîne respiratoire mitochondriale (Pisoschi and Pop, 2015).

III. Cibles biologiques du stress oxydatif

1. Effets sur les lipides

Les molécules les plus susceptibles de subir une oxydation sont les lipides. Les acides gras polyinsaturés peuvent facilement subir une attaque par le radical hydroxyle OH° , capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras, qui forme alors un nouveau radical diène conjugué. La peroxydation des acides gras insaturés comme l'acide arachidonique, mène à la formation d'isoprostanes, dont le niveau dans le plasma ou les urines est utilisé pour évaluer l'état de stress oxydatif d'un organisme (Cracowski, 2004). L'attaque oxydative des lipides entraîne aussi la formation de dérivés aldéhydes, tel que le 4-hydroxynonanal, capables de s'attacher aux protéines et d'altérer leur fonction (Pisoschi and Pop, 2015).

L'attaque des lipides concerne à la fois les lipides circulants et les phospholipides membranaires. L'attaque des lipides circulants aboutit à la formation de LDL (Low-Density Lipoproteins) oxydées qui participeront à la formation du dépôt lipidique de la plaque d'athérome impliquée dans les maladies cardiovasculaires. L'attaque des phospholipides membranaires quant à elle perturbe la fluidité de la membrane, altérant le fonctionnement de multiples récepteurs et transporteurs, et donc la transduction de signaux cellulaires (Palipoch and Koomhin, 2015; Liguori et al., 2018).

2. Effets sur les protéines

Les ERO sont capables d'oxyder le squelette des protéines, ainsi que leurs chaînes latérales, ce qui peut fragmenter les protéines ou entraîner des défauts de repliement, menant à une perte d'activité. Tous les acides aminés sont susceptibles d'être oxydés, en particulier les cystéines et les méthionines (Headlam and Davies, 2004). La plupart de ces oxydations sont réversibles sous l'action d'oxydoréductases, telles que la glutathion réductase. Certaines oxydations peuvent cependant être irréversibles, comme la formation de S-carboxyméthylcystéine ou la S-(2-Succinyl)cystéine, ces réactions impliquant la formation de liaisons covalentes (Alderson et al., 2006). Les acides aminés aromatiques sont aussi susceptibles d'être oxydés. Le radical hydroxyle peut par exemple oxyder la tyrosine, formant ainsi une dityrosine, ce qui génère en même temps une espèce réactive de l'azote, la 3-nitrotyrosine (Pisoschi and Pop, 2015).

3. Effets sur l'ADN

L'attaque radicalaire de l'ADN est quotidienne puisque le nombre de lésions se formant chaque jour dans une cellule est estimé à 10^4 , que ce soit au cours du métabolisme cellulaire normal ou par des réactions chimiques spontanées (Lindahl, 1993). Cinq principaux types de

dommages peuvent être induits par les ERO : des modifications de bases, des sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des pontages ADN-protéines et des cassures de brins de l'ADN (Figure I.4) (Cadet et al., 1999). Les bases de l'ADN sont particulièrement sensibles à l'oxydation, entraînant par exemple la formation de 8-oxoguanine, de Thymine glycol ou de 5-hydroxy-méthyl-uracile (Figure I.4, Tableau I.1). Le stress oxydatif peut aussi attaquer la liaison entre le sucre et le désoxyribose, créant un site abasique, ou cibler le sucre lui-même, produisant une coupure de chaîne simple brin. Les protéines pouvant aussi être modifiées, celles-ci forment des pontages lorsqu'elles entrent en contact avec l'ADN. Enfin la peroxydation des lipides génère des aldéhydes qui forment des adduits sur les bases de l'ADN. Les conséquences de ces modifications peuvent alors être des mutations ponctuelles ou des modifications globales du caryotype (délétion, insertion, translocation). Ces dommages peuvent être à l'origine de problèmes au niveau de la réplication, de la transcription et générer une instabilité génétique (Tableau I.1). La plupart de ces modifications sont donc impliquées dans les phénomènes de carcinogenèse, de vieillissement, et dans le développement de maladies cardiovasculaires, neurodégénératives ou auto-immunes (Palipoch and Koomhin, 2015).

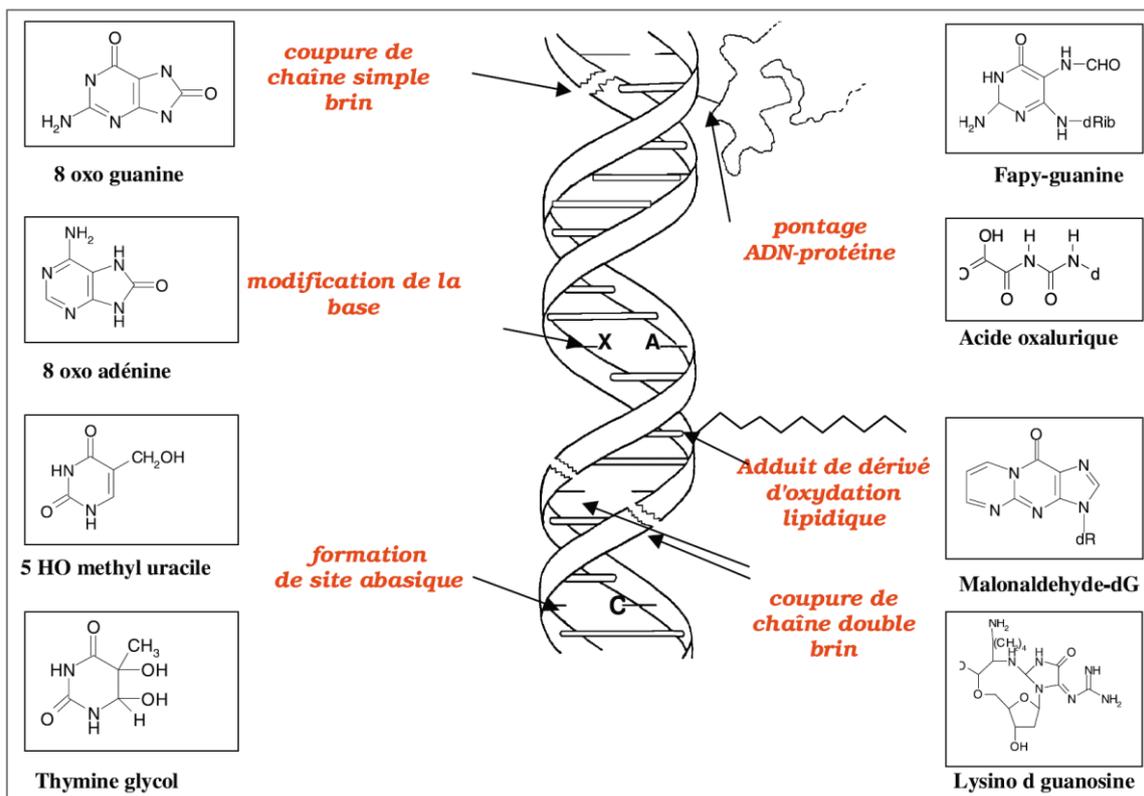


Figure I.4 : Différents types de lésions provoquées par les espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

Tableau I.1 : Types de lésions endogènes retrouvées dans l'ADN. Les conséquences potentielles et le nombre de lésions formées sont donnés pour chaque lésion. CDB : cassure double brin (Adapté d'après Abbotts and Wilson, 2017).

Lésion	Conséquence	Nombre / cellule / jour
Site abasique (AP)	Blocage de la fourche de réplication, conversion en CDB	≈ 10 000
Uracile (U•G)	Mutagène (C→T)	400
Thymine (T•G)	Mutagène (C→T)	30
7-méthylguanine	Tolérance, formation d'un site AP	4000
3-méthylguanine	Arrêt de la réplication, instabilité chromosomique	600
O ⁶ -méthylguanine	Mutagène (G→A)	≈ 200
Cassure simple brin	Blocage de la fourche de réplication, conversion en CDB	≈ 10 000
8-oxoguanine	Mutagène (G→T)	≈ 1000
Thymine glycol	Mutagène (T→C)	≈ 500

Certaines oxydations de base n'empêchent pas la réplication, mais elles peuvent cependant induire des erreurs lors de la réplication et générer des mutations ponctuelles. Par exemple, la cytosine est spontanément désaminée en uracile, et les ERO peuvent désaminer la cytosine en 5-hydroxyuracile (5-OHU). L'uracile et la 5-OHU s'apparient préférentiellement avec une adénine pendant la réplication, entraînant une mutation de GC → AT. De façon similaire, la guanine oxydée en 8-oxoG peut donner naissance à une mutation par transversion GC → TA (Shibutani et al., 1991). Des mutations de ce type sont retrouvées dans plusieurs types de cancer, attestant du rôle essentiel du BER (voie de réparation décrite dans le chapitre suivant) dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN. L'ARN peut également être oxydé. On trouve par exemple la présence de 8-hydroxyguanosine dans l'ARN. Des oxydations de l'ARN sont retrouvées dans de nombreuses pathologies, particulièrement dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Le dosage de 8-oxoguanosine est également utilisé dans le diagnostic du diabète de type 2 (Poulsen et al., 2012).

IV. Pathologies liées au stress oxydatif

Les effets nocifs d'un stress oxydatif pouvant toucher tous les types de composants cellulaires, les pathologies associées à ce stress sont nombreuses. Le système nerveux est le siège d'une forte phosphorylation oxydative et contient peu d'anti-oxydants endogènes. Ces paramètres font donc de cet organe une cible privilégiée des dommages oxydatifs. Le stress oxydatif est notamment impliqué dans le développement de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Uttara et al., 2009). Des études chez l'homme ont par exemple montré que la protéine β -amyloïde, le principal constituant des plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, pouvait altérer les complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces complexes étant impliqués dans la régulation des ERO et la production d'ATP, leur altération favorise la production d'ERO et une diminution

de production d'énergie dans la cellule (Bobba et al., 2013). La maladie de Parkinson est caractérisée par une perte progressive des neurones dopaminergiques dans la substance grise. Une autre caractéristique est la diminution de la concentration en acides gras polyinsaturés, ainsi qu'une augmentation des marqueurs de peroxydation lipidique et d'oxydation des protéines (Pisoschi and Pop, 2015). De plus, une augmentation des taux de 8-oxoG urinaires a été mise en évidence chez des patients atteints de la maladie, attestant de la production de dommages oxydatifs dans l'ADN (Seet et al., 2010).

Plusieurs maladies cardiovasculaires résultent de complications dues à la formation de plaques d'athérosclérose. L'athérosclérose peut toucher n'importe quelle artère du corps, que ce soit au niveau du cœur, du cerveau ou des reins, entraînant une diminution potentielle du flux sanguin (Palipoch and Koomhin, 2015). Comme vu précédemment, l'oxydation des lipides est au centre de la formation de l'athérosclérose. L'oxydation des LDL permet d'initier leur absorption par les macrophages, et donc la formation de cellules spumeuses (ou macrophages spumeux) à l'origine de la plaque d'athérosclérose (Witztum and Steinberg, 1991).

Les ERO pouvant réagir avec l'ADN et le modifier chimiquement, un fort potentiel mutagène/carcinogène leur est souvent associé. En effet de nombreux dommages peuvent entraîner un arrêt de la transcription, induire des erreurs de réplication, ou générer une instabilité génétique. Or tous ces événements sont associés au phénomène de tumorigenèse. Parmi les produits oxydés de l'ADN, la 8-oxoG est considérée comme un biomarqueur de carcinogénèse (Khansari et al., 2009). Le risque de cancer augmente généralement avec l'âge. L'accumulation de mutations non réparées au cours du temps pourrait être une explication à ce phénomène. En effet, une augmentation progressive et significative du taux de 8-oxoG est observée au cours du temps (Khansari et al., 2009). Les ERO peuvent enfin activer le facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa B), induisant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ou l'apoptose, ainsi que des facteurs de transcription (tels que c-fos ou c-jun) impliqués dans la transformation néoplasique et l'angiogénèse (Liguori et al., 2018).

Ces exemples de pathologies liées au stress oxydatif ne constituent pas une liste exhaustive. D'autres phénotypes tels que le diabète, le vieillissement, les maladies chroniques du rein ou la dégénérescence maculaire sont également concernés (Liguori et al., 2018). Le stress oxydatif peut donc avoir de nombreuses conséquences, et son contrôle par la cellule est primordial. Lorsque les défenses anti-oxydantes ne suffisent pas, d'autres mécanismes peuvent cependant se mettre en place pour prendre en charge les dommages cellulaires. Concernant l'ADN, plusieurs voies de réparation existent, chacune étant spécifique du type de dommage. Le chapitre suivant est dédié à la description de ces voies de réparation, avec un intérêt particulier porté au mécanisme de réparation par excision de base (BER), mécanisme étudié dans ce projet de recherche.

Chapitre II : Les mécanismes de réparation de l'ADN

Pour faire face aux dommages de l'ADN, la cellule possède différents mécanismes de réparation. Les modifications de bases de l'ADN peuvent être réparées par deux voies principales : la voie du BER (Base Excision Repair) et la voie du NER (Nucleotide Excision Repair). Le BER est chargé de prendre en charge les lésions non volumineuses de l'ADN, tandis que le NER devra réparer les lésions encombrantes, capables de déformer la molécule d'ADN (Dizdaroglu, 2012). Les deux voies sont décrites dans ce chapitre. Cependant la voie du BER, et plus spécifiquement son étape d'initiation, est au cœur de notre étude. C'est pourquoi le BER sera davantage décrit que le NER. Les voies de réparation des cassures simple et double brin seront également abordées, ce type de lésions étant particulièrement délétères pour la cellule.

I. La réparation par excision de base

1. Mécanisme global du BER

Le BER, découvert par Tomas Lindahl (Lindahl, 1974), reconnaît et répare les lésions non encombrantes de l'ADN, n'entraînant pas de distorsion importante de la double hélice d'ADN. Ces lésions peuvent être le résultat d'une oxydation, d'une alkylation ou d'une méthylation des bases de l'ADN. La réparation s'effectue grâce à quatre étapes principales : 1) la reconnaissance et l'excision de la base modifiée par une ADN glycosylase, 2) l'incision en 5' du site abasique résultant par une endonucléase, 3) la synthèse réparatrice de l'ADN par une polymérase, 4) la ligature des deux extrémités du brin d'ADN par une ligase (Figure II.1) (Meas et al., 2017).

L'initiation du BER commence donc par l'identification et l'excision de la lésion par une ADN glycosylase. Nous verrons par la suite que chaque lésion est reconnue par une ADN glycosylase spécifique. Cette première étape crée un site abasique apurinique ou apyrimidique (site AP) (Figure II.1A), clivé dans une seconde étape par l'endonucléase APE1 (AP-Endonuclease 1), générant ainsi des extrémités 3'OH et 5'phosphate désoxyribose (dRP) (Meas et al., 2017). A ce stade, la réparation peut en réalité évoluer vers deux voies distinctes : la voie à brèche courte ou la voie à brèche longue du BER. La voie dite à brèche courte du BER, aussi identifiée comme la voie de réparation d'un nucléotide simple, nécessite l'enzyme Pol β . Grâce à son activité lyase, la Pol β élimine l'extrémité 5'dRP, ce qui crée une brèche d'un nucléotide, ainsi qu'une extrémité 5' phosphate correcte. La brèche est alors comblée par l'incorporation d'un nucléotide, toujours par la Pol β , et les deux extrémités du brin d'ADN sont ligaturées par la ligase III (Figure II.1B) (Hegde et al., 2008). La voie de réparation dite à brèche longue remplace à l'inverse entre 2 et 12 nucléotides (Sattler et al., 2003). Cette voie est initiée par différentes polymérases en fonction de la nature de l'extrémité 5' : les Pol β , δ et/ou ϵ . Ces polymérases déplacent le brin d'ADN qui contient l'extrémité 5'dRP. Le fragment contenant l'extrémité dRP est ensuite clivé par l'endonucléase FEN-1 (5'-Flap Endonuclease 1), ce qui laisse des extrémités 3'OH et 5'P. L'intégrité du brin d'ADN réparé est enfin assurée par la

ligase I (Figure II.1C). L'action et le recrutement de FEN-1 et de la ligase I sont facilités par le cofacteur PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), qui agit comme une pince coulissante. Le choix entre ces deux voies pourrait dépendre du type d'ADN glycosylase utilisée pour l'initiation (Bauer et al., 2015), ou de l'état du cycle cellulaire dans lequel la réparation a lieu (Mjelle et al., 2015). Dans tous les cas, la voie dite à brèche longue est nécessaire lorsque le site AP est oxydé par les ERO, générant ainsi des extrémités bloquantes en 5' après le clivage par APE1, incapables d'être prises en charge par la Pol β (Hegde et al., 2008).

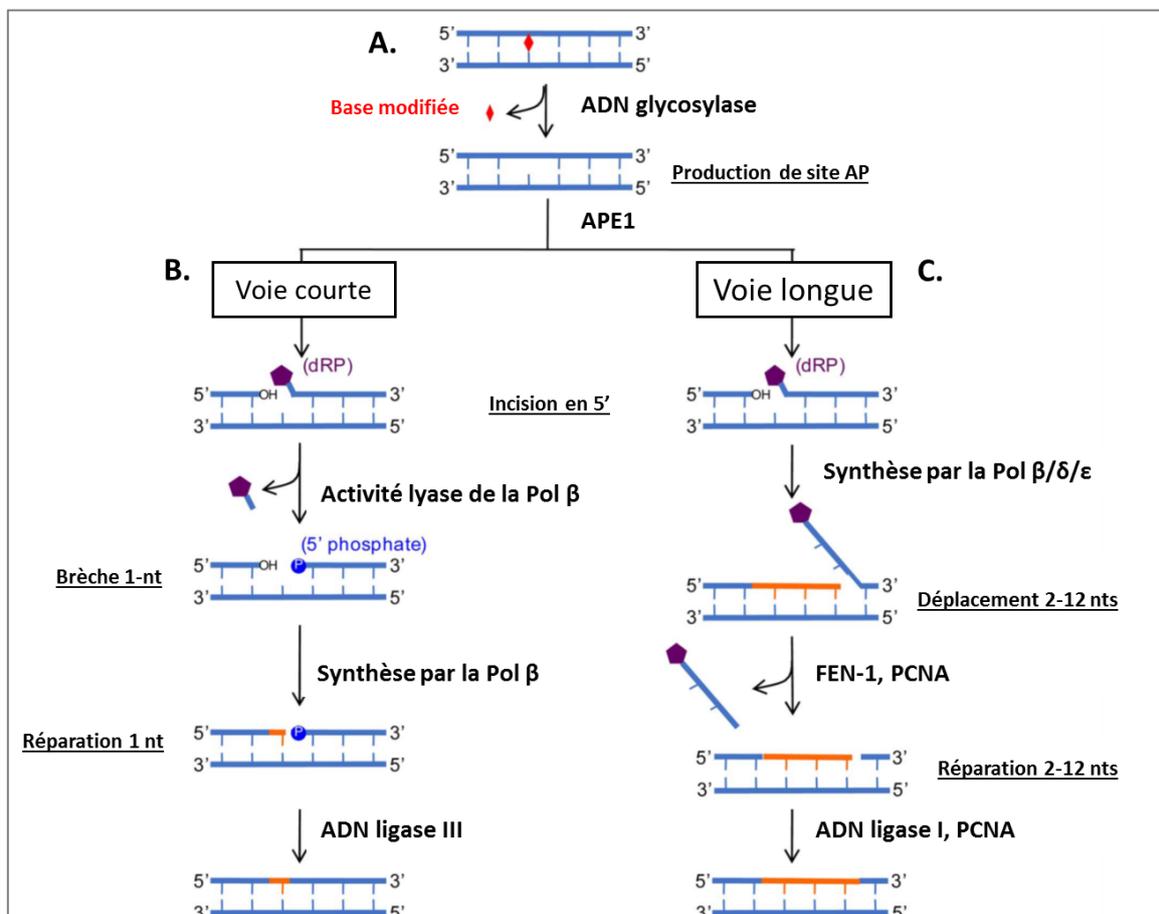


Figure II.1 : Mécanismes de réparation par excision de base. A. La base modifiée de l'ADN est reconnue et excisée par une ADN glycosylase qui clive la liaison N-glycosidique de la base. Cette étape crée un site abasique (site AP), incisé par APE1 en 5'. Ce substrat peut être pris en charge par la voie à brèche courte ou brèche longue du BER. B. La voie à brèche courte nécessite l'action de la polymérase β et de la ligase III pour réparer un nucléotide simple. C. La voie à brèche longue à l'inverse implique différentes polymérases ($\beta/\delta/\epsilon$) qui permettent de synthétiser entre 2 et 12 nucléotides. L'ADN déplacé est clivé par FEN-1, et l'intégrité du brin nouvellement synthétisé est assurée par la ligase I. Ces deux dernières étapes sont coordonnées par PCNA. BER : Base Excision Repair ; dRP : désoxyribose phosphate ; nt : nucléotide (Adapté d'après Meas et al., 2017).

2. Initiation de la réparation : pour chaque lésion une ADN glycosylase spécifique

La détection et l'excision des lésions est initiée par des enzymes ADN glycosylases. Ces enzymes sont relativement petites (environ 30 à 50kDa) et ne nécessitent aucun cofacteur pour

leur activité. Les ADN glycosylases sont classées en trois catégories, en fonction du type de lésions qu'elles réparent : 1) les ADN glycosylases qui prennent en charge un uracile, 2) les ADN glycosylases qui réparent les bases alkylées, 3) les ADN glycosylases spécifiques des bases oxydées (Tableau II.1). Ces enzymes se distinguent également par leur capacité ou non à inciser le brin d'ADN sur lequel elles ont excisé la lésion. On distingue alors les enzymes monofonctionnelles, incapables de cliver le brin d'ADN, et les enzymes bifonctionnelles, qui possèdent en plus de leur activité ADN glycosylase une activité AP-lyase (Hegde et al., 2008).

La première ADN glycosylase découverte chez *E.Coli* fut UDG (Lindahl, 1974), chargée de reconnaître un uracile apparié dans l'ADN avec une guanine, cet uracile provenant de la désamination d'une cytosine. D'autres enzymes capables de prendre en charge un uracile ont ensuite été découvertes : SMUG1 (Haushalter et al., 1999), TDG (Hardeland et al., 2003) et UNG2 (Kavli et al., 2002). Les bases purines peuvent également être méthylées, générant des produits tels que 3-méthylA, 3-méthylG et 7-méthylA. Ces lésions sont prises en charge par l'enzyme MPG (AlkA chez *E.Coli*) (Labahn et al., 1996).

La troisième catégorie d'enzymes est constituée des ADN glycosylases qui réparent les bases oxydées (Tableau II.1). Toutes ces enzymes (excepté MYH, dont le fonctionnement sera décrit dans la section suivante) sont bifonctionnelles. L'activité AP-lyase de ces enzymes permet de cliver le site abasique, ce qui forme néanmoins une extrémité 3' bloquante qui doit être prise en charge par APE1. Une fois que les extrémités correctes 3'OH et 5'P sont générées, les étapes suivantes peuvent alors avoir lieu (actions de la Pol β et de la ligase III). Ces enzymes sont réparties en deux sous-catégories, en fonction de leur structure tertiaire et des caractéristiques de leur site actif (McCullough et al., 1999) : la famille Nth (Endonucléase III) ou la famille Fpg(MutM)/Nei(Endonucléase VII). L'activité catalytique utilise un résidu lysine ou proline, dans la famille Nth ou Fpg/Nei respectivement (Hegde et al., 2008). Les homologues fonctionnels ont ensuite été découverts chez l'homme : NTH1 et OGG1 appartiennent à la famille Nth, tandis que NEIL1 et NEIL2 correspondent à la famille Fpg/Nei. NTH1 répare les pyrimidines oxydées (Ikeda et al., 1998) et OGG1 est chargée d'éliminer les formes 8-oxoG et Fapy-G (Formamidopyrimidine-Guanine) (Krokan et al., 2000). Les NEILs éliminent les formes thymine glycol (Tg), Fapy-G et Fapy-A et 5-OHU/5-OHC (5-hydroxyuracile/5-hydroxycytosine) (Hazra et al., 2002). Il a également été montré que NEIL1 peut contribuer à l'élimination de la 8-oxoG, suggérant une voie de backup (ou voie de secours) dans la réparation de cette lésion (Morland et al., 2002). Dans cette même étude une troisième enzyme est décrite, nommée NEIL3. Cette protéine possède une activité particulière pour l'excision des Tg présentes dans les télomères (Zhou et al., 2013).

Il a été proposé que les ADN glycosylases se lient aléatoirement sur l'ADN, et « glissent » le long de l'ADN jusqu'à ce qu'elles reconnaissent la lésion (Prakash et al., 2012). La base contenant la lésion est alors délogée pour se retrouver dans le site actif de la glycosylase. Ceci permet à l'enzyme d'hydrolyser la liaison N-glycosidique de la base, créant ainsi un site AP (Drohat and Maiti, 2014).

Tableau II.1 : Liste des ADN glycosylases chez les mammifères. Tg : Thymine glycol ; 8-oxoG : 8-oxoguanine ; 5-OHU : 5-hydroxyuracile ; 5-OHC : 5-hydroxycytosine ; Fapy : Formamidopyrimidine (Adapté d'après Hegde et al., 2008).

Enzyme		Type	Substrats
ADN glycosylases spécifiques de l'uracile (UDG)	UNG	Monofonctionnelles	Uracile
	SMUG		Uracile
	TDG		U et T dans U(T)•G
ADN glycosylases des bases alkylées	MPG	Monofonctionnelle	3-méthyladénine, 3-méthylguanine, 3-méthyladénine, hypoxanthine
ADN glycosylase spécifique du mismatch avec l'adénine	MYH	Monofonctionnelle	A dans 8-oxoG•A
ADN glycosylases des bases oxydées	NTH1	Bifonctionnelles (β)	Tg, 5-formylU
	OGG1		8-oxoG, Fapy-G
	NEIL1	Bifonctionnelles ($\beta\delta$)	Fapy-A(-G), Tg, 5-OHU
	NEIL2		5-OHU, 5-OHC, Tg
NEIL3		Fapy-A(-G), Tg	

3. Mécanismes de réparation de la 8-oxoguanine

a. La 8-oxoguanine, une lésion particulière

Les ERO peuvent endommager toutes les bases de l'ADN. Cependant la guanine (Figure II.2A), du fait de son faible potentiel redox, est particulièrement sensible à l'oxydation (David et al., 2007). Cette oxydation peut directement cibler la guanine présente dans la molécule d'ADN, ainsi que celle présente dans le pool de nucléotides sous la forme de dGTP. La forme oxydée la plus abondante de la guanine correspond à la 7,8-dihydro-8-oxo-2'deoxy-Guanine (8-oxoG) (David et al., 2007). Cette forme 8-oxoG est générée par l'introduction d'un groupe oxo sur le carbone 8 (C8) et d'un hydrogène sur l'azote en position 7 (N7) (Figure II.2B) (Markkanen, 2017).

La 8-oxoG n'est pas considérée comme une lésion bloquante par les ADN polymérase, puisqu'elle n'induit pas l'arrêt de la fourche de réplication (Shibutani et al., 1991). Lors de la réplication, la 8-oxoG en conformation *syn* dans la matrice favorise l'incorporation d'une adénine au lieu d'une cytosine (Figure II.2D) (David et al., 2007). Une seconde réplication peut alors entraîner la formation d'une mutation de transversion des bases GC \rightarrow TA. Nous verrons dans la suite de cette section que plusieurs enzymes coexistent pour éviter la mutagenèse induite par la 8-oxoG.

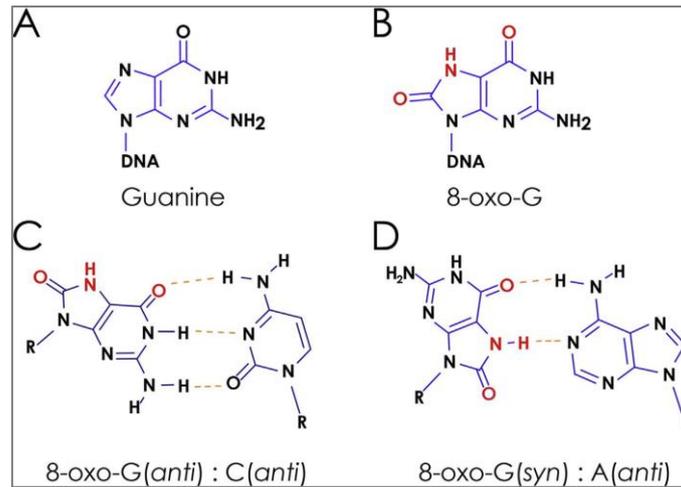


Figure II.2 : Structure de la 8-oxoG et de ses appariements possibles. La guanine (A) peut être oxydée en 8-oxoguanine (8-oxoG) (B) par les ERO. Sa conformation influence son appariement avec une autre base de l'ADN : la forme *syn*, qui mime une thymine, s'apparie avec une adénine (D), tandis que la forme *anti* s'apparie normalement avec une cytosine (C) (D'après Markkanen, 2017).

Comme évoqué précédemment, les ERO peuvent également cibler le pool de nucléotides. Les dNTPs (désoxyribonucléotides), les précurseurs de l'ADN, peuvent donc aussi subir des attaques oxydatives. L'oxydation du dGTP conduit à la formation de 8-oxo-dGTP (Rudd et al., 2016). Une fois incorporée dans l'ADN, cette forme oxydée pourra être prise en charge de façon similaire à la 8-oxoG. Si la 8-oxo-dGTP est insérée en face d'une cytosine, elle peut être prise en charge par OGG1. Si la 8-oxo-dGTP est insérée en opposition d'une adénine, OGG1 ne peut plus reconnaître la base modifiée et ce mésappariement est pris en charge par l'enzyme MYH qui élimine l'adénine en face de la 8-oxoG entraînant la formation d'une transversion AT → CG lors de la réplication suivante (Figure II.3). De telles mutations induites par l'incorporation de 8-oxo-dGTP ont été mises en évidence dans des cellules mammifères (Satou et al., 2007). L'élimination de la 8-oxo-dGTP avant son incorporation dans l'ADN permettrait donc de prévenir l'apparition de ce type de mutation. Il existerait quatre enzymes capables d'hydrolyser la 8-oxo-dGTP : MTH1, MTH2, MTH3 et NUDT5 (Markkanen, 2017). Ces enzymes catalysent l'hydrolyse de la 8-oxo-dGTP en 8-oxo-dGDP ou 8-oxo-dGMP. Comme les ADN polymérase ne peuvent pas utiliser la 8-oxo-dGMP pour la synthèse de l'ADN, cette hydrolyse permet de prévenir l'incorporation de la forme oxydée. Parmi les quatre enzymes, MTH1 serait la principale enzyme capable de nettoyer le pool de nucléotides, les trois autres servant de systèmes de secours (Rudd et al., 2016).

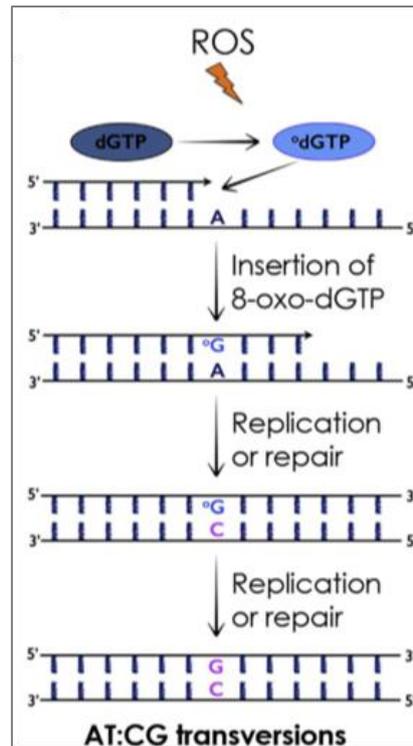


Figure II.3 : Mécanisme de formation des mutations induites par la 8-oxodGTP. Les ERO peuvent oxyder la dGTP présente dans le pool de nucléotides. La forme oxydée °dGTP peut être insérée dans la molécule d'ADN en face d'une adénine (A). Dans ce cas une transversion AT → CG peut apparaître après deux cycles de réplication si la lésion d'origine n'est pas réparée (D'après Markkanen, 2017).

Normalement, la 8-oxoG est donc prise en charge par l'ADN glycosylase OGG1 (8-oxoguanine DNA-Glycosylase 1), qui initie la réparation de la lésion par la voie du BER (Boiteux et al., 2017). OGG1 est capable de prendre en charge la 8-oxoG uniquement lorsque celle-ci est appariée à une cytosine (Girard et al., 1997). Si la lésion échappe à ce premier point de réparation, la Pol δ de la réplication peut potentiellement insérer une base incorrecte, une adénine, en opposition de la 8-oxoG (Figure II.4A) (Shibutani et al., 1991; van Loon and Hübscher, 2009). Cette étape entraîne donc l'apparition d'un mauvais appariement : 8-oxoG•A. A ce stade, il est important de comprendre que la base qui doit être corrigée est l'adénine, et non la 8-oxoG. En effet si l'adénine n'est pas éliminée, un nouveau cycle de réplication va insérer une thymine en face de l'adénine, menant à la formation d'une mutation transverse de GC → TA (Figure II.4A). Il est donc crucial de pouvoir éliminer l'adénine de la forme 8-oxoG•A. L'enzyme chargée de cette élimination est l'ADN glycosylase MYH (Markkanen et al., 2013). MYH est une ADN glycosylase non conventionnelle, puisqu'elle n'élimine pas directement une base modifiée, et que son fonctionnement est monofonctionnel. Cette enzyme donne donc une « seconde chance » aux cellules de corriger la 8-oxoG. Pour ce faire, MYH utilise la voie dite longue du BER (Maga et al., 2007; van Loon and Hübscher, 2009). Suite au clivage de l'adénine, APE1 permet une fois encore de cliver le site abasique. Une autre enzyme, la polymérase λ , permet ensuite d'insérer correctement une cytosine en face de la 8-oxoG, avec l'aide de deux cofacteurs, PCNA et RPA (Replication Protein A) (Maga et al., 2007). La réparation par la Pol λ utilise la voie longue du BER puisqu'elle remplace un deuxième nucléotide en aval de la lésion, ce qui requiert l'action de FEN-1 et de la ligase I (van Loon and

Hübscher, 2009). Le produit final de ces différentes étapes est un appariement 8-oxoG•C, capable d'être pris en charge par la voie à brèche courte du BER, initiée par OGG1 (Figure II.4A). La réparation de la 8-oxoG peut être donc être prise en charge par la voie à brèche courte ou longue du BER (Sattler et al., 2003). Les enzymes OGG1 et MYH accompagnées de MTH, l'enzyme responsable de nettoyer le pool de nucléotides des dGTP oxydées, forment à elles trois le système mammifère GO, permettant d'éliminer efficacement les formes oxydées de guanines (Figure II.4) (Markkanen, 2017). Le système GO fut cependant tout d'abord découvert chez *E.Coli*, alors composé de MutM (ou Fpg, homologue d'OGG1), MutY (homologue de MYH) et MutT (homologue de MYH) (Michaels and Miller, 1992; Boiteux and Radicella, 1999).

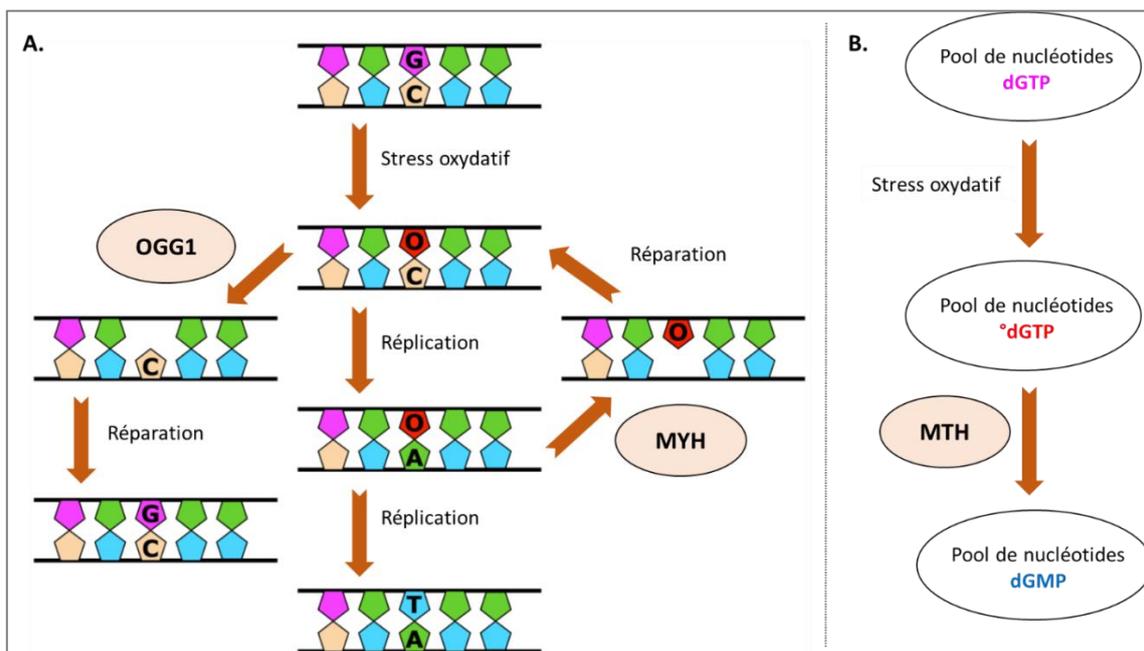


Figure II.4 : Système GO mammifère. Les cellules possèdent trois mécanismes majeurs pour faire face aux 8-oxoG. L'oxydation directe de la guanine présente dans l'ADN peut être prise en charge par OGG1. En cas d'une première répllication, l'adénine insérée en face de la 8-oxoG est éliminée par l'enzyme MYH, permettant de réintroduire une cytosine en face de la 8-oxoG, ce qui donne une seconde chance à la cellule de réparer la 8-oxoG par OGG1. La forme dGTP oxydée (^odGTP) dans le pool de nucléotides peut être éliminée par MTH, ce qui prévient l'introduction d'une forme oxydée de la guanine dans l'ADN par les ADN polymérasés (Adapté d'après David et al., 2007).

La 8-oxoG est avant tout considérée comme une marque de pro-mutagenèse car cette lésion n'est bloquante ni pour la répllication (Shibutani et al., 1991), ni pour la transcription (Larsen et al., 2004; Charlet-Berguerand et al., 2006). Récemment, plusieurs études se sont intéressées aux effets de la 8-oxoG lorsque celle-ci est présente dans la séquence promoteur d'un gène. Il a ainsi été mis en évidence que la présence de la lésion dans les sites promoteurs des gènes *VEGF* (Fleming et al., 2017), *TNF α* (Pan et al., 2016) et *SIRT1* (Antoniali et al., 2014) était liée à une augmentation de la transcription. Cette stimulation de la transcription ferait notamment intervenir la formation de G-quadruplex (Fleming et al., 2017). Ainsi, il est suggéré que la 8-oxoG pourrait servir de signal épigénétique dans les cellules en condition de stress oxydatif. De plus, le séquençage du génome de fibroblastes murins a révélé deux types de sites

enrichis en 8-oxoG : dans les promoteurs de gènes et dans les régions non traduites ou régions UTR (UnTranslated regions) (Ding et al., 2017). Ces résultats proposent donc une 8-oxoG à double facette, avec un effet pro-mutagenèse d'un côté, et des rôles régulateurs de l'autre.

b. Découverte, structure et mécanisme d'action d'OGG1

Le gène *OGG1* eucaryote fut cloné pour la première fois chez *S. cerevisiae*. Ce gène est localisé sur le chromosome XIII et code pour une protéine de 43 kDa composée de 376 acides aminés (van der Kemp et al., 1996). Bien qu'OGG1 (chez la levure) et Fpg (chez *E. Coli*) soient des homologues fonctionnels, ils ne partagent pour autant pas leur structure. En effet, OGG1 est un membre de la famille dite HhH des ADN glycosylases, tandis que Fpg appartient à la famille H2TH (Boiteux et al., 2017). Le gène *OGG1* fut cloné peu de temps après chez les mammifères, codant une protéine de 39 kDa composée de 345 acides aminés (Radicella et al., 1997).

Comme mentionné précédemment, la forme humaine d'OGG1 est proche des ADN glycosylases de la famille dite HhH. Les enzymes de la famille HhH contiennent toutes un motif d'hélice en épingle à cheveux (Helix-hairpin Helix pour HhH) contenant la lysine catalytique (K249 pour OGG1), suivie d'une boucle riche en glycine et proline et d'un acide aspartique catalytique (D268 pour OGG1) (Figure II.5) (Bjørås et al., 2002). D'autres résidus participent également à la liaison d'OGG1 avec la 8-oxoG tels que les résidus G42, Q315 et F319, sans posséder d'activité catalytique (Figure II.5) (Bruner et al., 2000; van der Kemp et al., 2004). Parmi ces résidus, la glycine 42 est particulièrement importante, puisqu'elle seule permet de discriminer la base guanine modifiée d'une base guanine normale. En effet OGG1 reconnaît la 8-oxoG grâce à une liaison hydrogène spécifique entre la G42 et le N7 de la 8-oxoG (Bruner et al., 2000). OGG1 établit des interactions avec le brin d'ADN contenant la lésion à proximité de la lésion, mais n'entre en contact qu'avec la cytosine du brin opposé via les résidus R154 et R204. Ce contrôle supplémentaire permet à OGG1 d'éviter d'éliminer une 8-oxoG qui serait appariée à une adénine. Le motif HhH interagit avec le côté 3' de la lésion et positionne l'enzyme pour reconnaître la lésion. Ceci entraîne une courbure de l'ADN centrée sur la base endommagée et permet à OGG1 d'interagir avec l'ADN courbé. Cet ADN courbé est stabilisé par les résidus R154, N149, Y203 et R204, ce qui permet de combler le vide généré par l'extrusion de la lésion (Bruner et al., 2000).

OGG1 est une ADN glycosylase bifonctionnelle, possédant donc une activité lyase en plus de son activité glycosylase. Cependant, il a été montré *in vitro* que son activité lyase serait très faible (Vidal et al., 2001a). En réalité OGG1 fonctionne dans la cellule comme une ADN glycosylase monofonctionnelle où l'activité glycolytique est portée par le résidu K249, capable de cliver la liaison N-glycosidique de la 8-oxoG avec l'aide du résidu D268, sans nécessairement cliver le site AP résultant de l'excision de la base (Dalhus et al., 2011).

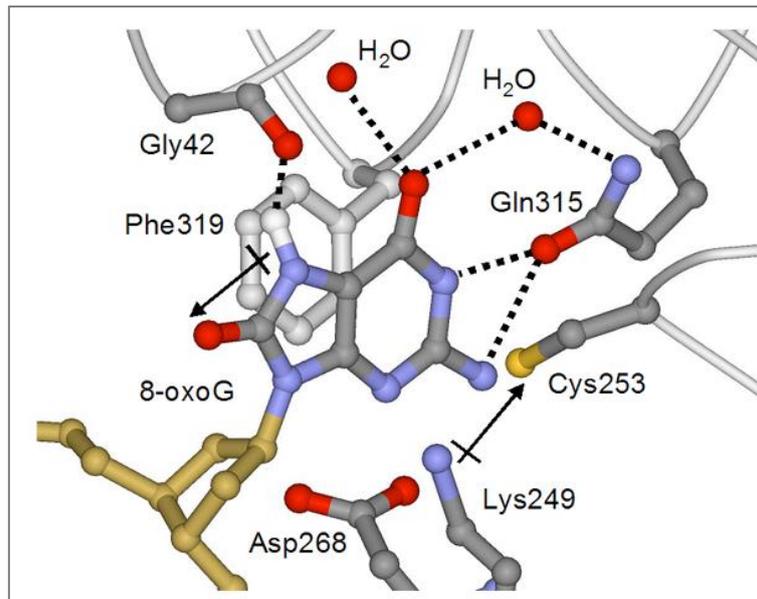


Figure II.5 : Complexe de reconnaissance de la 8-oxoG par OGG1. Ce graphique représente la poche de reconnaissance d'OGG1 vis-à-vis de la 8-oxoG et présente les résidus impliqués dans le processus. L'activité catalytique est portée par les résidus Lys249 et Asp268. La liaison hydrogène entre le résidu Gly42 et le N7 de la 8-oxoG permet de discriminer la guanine modifiée d'une base normale. Les résidus Phe319 et Gln315 sont également impliqués dans la reconnaissance de la 8-oxoG (D'après David et al., 2007).

Avant de pouvoir exciser la 8-oxoG, OGG1 doit cependant pouvoir la trouver. Le processus de recherche de la 8-oxoG *in vitro* sur un ADN nu est extrêmement rapide et bidirectionnel, et OGG1 serait capable de scanner plus d'un million de pb par seconde. Le temps de liaison d'une ADN glycosylase à un ADN normal étant de 0,025 s, OGG1 pourrait donc scanner 440 pb avant de se dissocier du brin d'ADN (Blainey et al., 2006). La cinétique de recherche et de reconnaissance de la 8-oxoG est divisée en trois temps. L'enzyme forme d'abord un « complexe d'interrogation » non spécifique, qui permet à l'ADN glycosylase de se déplacer le long de la molécule d'ADN en cherchant la base modifiée (première étape). Lorsqu'OGG1 rencontre la lésion grâce aux différents résidus présentés dans le paragraphe précédent, la courbure de l'ADN créée par OGG1 permet l'extrusion de la 8-oxoG et sa stabilisation au sein du site actif (deuxième étape). Cette dernière étape permet la formation du complexe de reconnaissance de la lésion à proprement dit, dans lequel la 8-oxoG est finalement clivée (troisième étape) (Kuznetsov et al., 2005).

Les processus de reconnaissance et de clivage de la 8-oxoG par OGG1 *in vitro* sont donc relativement bien connus. Cependant, la dynamique d'OGG1 dans le noyau, ainsi que les mécanismes la régulant, sont aujourd'hui encore mal connus. Il a été montré chez l'homme qu'un stress oxydatif induit par bromate de potassium était capable d'induire le recrutement d'OGG1 et d'autres protéines du BER sur la chromatine, spécifiquement dans les régions d'euchromatine (Amouroux et al., 2010). Ce recrutement n'est par ailleurs pas dépendant de la reconnaissance de la lésion, puisqu'une forme mutante d'OGG1 (F319A), incapable de reconnaître la lésion et donc de la cliver, est toujours capable d'être recrutée sur la fraction chromatiniennne. Une question reste alors pour le moment sans réponse : Si OGG1 n'a pas

besoin de reconnaître la lésion pour être recrutée sur l'ADN, quel est le signal permettant de déclencher sa dynamique de recrutement spécifique après un stress oxydatif ?

c. Modifications post-traductionnelles d'OGG1

Des modifications post-traductionnelles (MPT) d'OGG1 ont été décrites, principalement des phosphorylations ou des acétylations, suggérant des mécanismes de régulation de l'activité d'OGG1. Initialement, une étude dans des cellules humaines a montré qu'OGG1 était majoritairement associée avec la chromatine et la matrice nucléaire pendant l'interphase, tandis qu'elle s'associait avec la chromatine condensée pendant la mitose (Dantzer et al., 2002). La fraction d'OGG1 liée à la chromatine était de plus phosphorylée sur un résidu sérine, probablement par la kinase PKC (Protein Kinase C). Les trois sites potentiels de phosphorylation proposés étaient en S44, S211 et T295. La même équipe a ensuite montré qu'OGG1 était localisée dans le nucléole pendant la phase S du cycle cellulaire. Cette localisation était dépendante d'un résidu sérine en position 326. En effet lorsque cette sérine est remplacée par une cystéine (forme mutante OGG1-Cys³²⁶), OGG1 devient complètement exclue du nucléole (Luna et al., 2005). Finalement, ces deux études montrent une localisation intranucléaire d'OGG1 qui est dépendante de son état de phosphorylation.

L'activité de ce polymorphisme d'OGG1 en condition de stress ou non a également été étudiée. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré une diminution modérée de l'activité glycolytique de la forme S326C en comparaison de la forme normale, ainsi qu'une plus faible affinité d'OGG1 pour son substrat avec la forme mutante (Dherin et al., 1999; Hill and Evans, 2006; Bravard et al., 2009). L'activité glycolytique de la forme OGG1-S326C n'est de plus nullement stimulée par la présence d'APE1 (Hill and Evans, 2006). Enfin la forme OGG1-S326C apparaît plus sensible aux agents oxydants que la forme normale, comme le démontre l'exposition de cellules au cadmium ou au diamide (Bravard et al., 2006, 2009). L'ensemble de ces études met en avant un défaut fonctionnel majeur du polymorphisme OGG1-S326C, qui a notamment été relié au risque de développer différents types de cancers (détaillé dans la section suivante « Pathologies associées à la réparation de la 8-oxoG »).

Une autre étude chez la levure a mis en évidence une interaction entre OGG1 et deux kinases *in vitro* et *in vivo* : Cdk4, une sérine-thréonine kinase, et c-Abl, une tyrosine kinase. *In vitro*, OGG1 est phosphorylée par Cdk4, ce qui stimule son activité catalytique. En effet l'activité de l'enzyme est 2.5 fois plus importante suite à cette phosphorylation. OGG1 est également phosphorylée par c-Abl, même si cette phosphorylation n'affecte pas l'activité catalytique de l'enzyme (Hu et al., 2005).

Enfin il a été montré qu'OGG1 pouvait être acétylée par le cofacteur p300. Cette acétylation concerne deux résidus lysine (K338 et K341), et augmente significativement l'activité d'OGG1 *in vitro* et *in vivo* en présence de l'endonucléase APE1. Cette acétylation est de plus augmentée de 2.5 fois après un stress oxydatif par glucose oxydase (enzyme qui catalyse l'oxydation du glucose en peroxyde d'hydrogène) (Bhakat et al., 2006).

L'ensemble de ces études nous prouvent que la régulation d'OGG1, concernant aussi bien sa localisation que son activité catalytique, dépend en partie des MPT subies par l'enzyme dans le contexte cellulaire.

d. Pathologies associées à la réparation de la 8-oxoguanine

Comme décrit dans les paragraphes précédents, la 8-oxoG est une lésion possédant un fort potentiel mutagène. Son rôle dans la formation de cancers a donc naturellement été étudié, chez la souris comme chez l'homme. Plusieurs équipes ont généré des souris knock-out (KO, souris génétiquement modifiées pour inactiver un gène) *Ogg1* (souris *Ogg1*^{-/-}). Les souris *Ogg1*^{-/-} sont viables, fertiles et ne présentent pas de pathologie apparente à l'âge adulte. Cependant une augmentation de la fréquence de mutations spontanées de GC→TA a pu être observée dans les cellules du foie, suggérant l'accumulation de lésions 8-oxoG (Klungland et al., 1999; Minowa et al., 2000). Une autre étude chez des souris *Ogg1*^{-/-} a rapporté une augmentation du nombre de tumeurs du poumon (5 fois plus que chez les souris contrôles) lorsque les souris atteignent l'âge de 18 mois (Sakumi et al., 2003). Enfin deux études ont mis en évidence l'accumulation de 8-oxoG dans les reins de souris *Ogg1*^{-/-} traitées par bromate de potassium, sans cependant observer de développement de tumeurs (Arai et al., 2002, 2006). L'inactivation du gène *Ogg1*, bien qu'augmentant le taux de mutagenèse dans les tissus, n'apparaît pas suffisante pour induire le développement de cancers. Une hypothèse plausible serait la présence bien connue de l'enzyme MYH, qui donne une seconde chance à la cellule de corriger la 8-oxoG. Des souris KO *Myh* ne présentent pas de pathologie apparente en comparaison des souris contrôles (Xie et al., 2004). Cependant des souris *Myh*^{-/-} traitées au bromate de potassium développent davantage de tumeurs de l'intestin (Sakamoto et al., 2007). Enfin des souris doublement invalidées des gènes *Ogg1* et *Myh* ont été générées. Ces souris *Ogg1*^{-/-}*Myh*^{-/-}, bien qu'étant viables et fertiles, développent rapidement plusieurs types de tumeurs (du poumon, de l'intestin, ovarien et lymphomes) et présentent une survie fortement réduite (50% de survie à l'âge de 10 mois) (Xie et al., 2004). De plus ces souris ont une forte accumulation de 8-oxoG dans le foie, le poumon et l'intestin (Russo et al., 2004). Ces résultats suggèrent une forte prédisposition au développement de cancers lorsque les deux principales enzymes du système GO sont déficientes.

Toutes ces études chez l'animal ont été complétées par des études chez l'homme, visant à trouver un lien entre des mutations du gène *OGG1* et le développement de tumeurs. Des mutations somatiques et des polymorphismes du gène ont été recherchés dans le génome humain, normal et pathologique (Weiss et al., 2005). Des mutations somatiques rares ont alors été mises en évidence dans les cancers gastrique, du poumon, du rein et de la tête et du cou (Shinmura et al., 1998; Chevillard et al., 1998; Blons et al., 1999; Audebert et al., 2000). Des polymorphismes ont également été identifiés (plus de 200). Parmi eux le polymorphisme le plus étudié est la forme S326C décrite dans le paragraphe précédent (équivalent au remplacement d'une sérine par une cystéine en position 326), à cause de sa forte fréquence dans la population caucasienne (23 à 41%) (Hung et al., 2005). Ce polymorphisme est associé avec un facteur de risque élevé de développer un cancer du poumon (Hung et al., 2005; Kohno et al., 2006), gastrique (Farinati et al., 2008), de la prostate (Chen et al., 2003) et oropharyngé (Elahi et al., 2002). Des taux élevés de 8-oxoG dans l'ADN ont de plus été observés chez les porteurs de la forme *OGG1*-S326C au niveau des cellules sanguines mononucléaires (Ji et al., 2013) et dans le sperme d'individus fumeurs (Ji et al., 2013). Même si les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore complètement compris, il semblerait que ce polymorphisme soit hypersensible à l'inactivation d'*OGG1* engendrée par le monoxyde d'azote, traduite par une

réparation plus lente des dommages oxydatifs par rapport à la forme normale (Moritz et al., 2014).

L'impact de mutations du gène *MYH* a de même été exploré chez l'homme. En 2002, des mutations germinales bi-alléliques du gène *MYH* ont été identifiées chez des patients d'une même famille atteinte de cancer colorectal. Les tumeurs de ces patients étaient caractérisées par une forte proportion de transversions de GC vers TA, caractéristiques d'un défaut d'activité de *MYH*. Depuis, de nombreuses études ont confirmé l'association de ces mutations avec ce type de cancers, référencés sous le nom « MAP » (MYH-Associated Polyposis). Aujourd'hui plus de 30 polymorphismes du gène sont connus, dont les plus communs sont Y165C et G382D. Ces polymorphismes touchent plus ou moins l'activité glycosylase de l'enzyme et sa capacité à se lier à son substrat. Même si les patients MAP sont principalement atteints de cancers colorectaux, des études ont également rapporté une association avec un facteur de risque élevé de développer un cancer de l'ovaire, de la vessie ou un cancer de la peau (Wallace et al., 2012).

Des changements dans l'expression d'OGG1 ainsi que des polymorphismes ont enfin été associés avec des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la maladie d'Huntington (Markkanen, 2017). Une étude récente a étudié l'expression de plusieurs protéines du BER dans le sang périphérique de 100 patients atteints de la maladie d'Alzheimer, en comparaison de 110 volontaires sains. L'analyse des échantillons a révélé une diminution significative d'OGG1 chez les patients comparé aux volontaires sains (Sliwinska et al., 2017). Certaines mutations hétérozygotes d'OGG1 ont également été associées à cette même maladie : une délétion, créant une forme OGG1- Δ C59, et deux substitutions, menant aux formes OGG1-A53T et OGG1-A288V (Mao et al., 2007). Les deux formes possédant une substitution altèrent de plus l'activité catalytique d'OGG1 (Jacob et al., 2013). L'ensemble de ces résultats suggèrent une corrélation entre un défaut de réparation de la 8-oxoG et le développement de cette maladie. Cependant, ces études ne prouvent en aucun cas que ces deux événements soient directement liés, et des recherches plus poussées seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle d'OGG1 dans ce type de pathologies.

4. Clivage du site abasique

APE1 fut clonée au début des années 90 chez les mammifères (Demple et al., 1991). Le gène humain est composé de quatre introns et cinq exons, codant pour une protéine de 35 kDa. La forme mammifère se distingue de son homologue bactérien (Xth) par une extension N-terminale de 61 résidus, qui contient entre autres le signal de localisation nucléaire et une activité redox importante pour la régulation de plusieurs facteurs de transcription. La région C-terminale quant à elle contient les résidus impliqués dans son activité catalytique (Izumi and Mitra, 1998). Le domaine d'APE1 proche de son extrémité N-terminale est donc responsable d'un rôle indépendant de son action dans la réparation. Ce domaine possède une fonction de régulation redox qui participe à l'activation de certains facteurs de transcription tels que p53 (Gaiddon et al., 1999), Fos-Jun (Xanthoudakis et al., 1992), NF κ B (Nishi et al., 2002), ou encore HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 alpha) (Huang et al., 1996), cette liste n'étant pas exhaustive. Pour remplir cette fonction, APE1 contrôle l'état redox des résidus cystéine

localisés dans les domaines de liaison sur l'ADN ou au sein des régions régulatrices appartenant aux facteurs de transcription. En effet, certains facteurs ont besoin que des résidus cystéine spécifiques soient présents sous forme réduite pour se lier à leur cible. En maintenant ces cystéine réduites, APE1 fournit un mécanisme de régulation de l'expression des gènes (Abbotts and Madhusudan, 2010).

L'endonucléase APE1, commune aux voies courtes et longues du BER, est l'enzyme responsable du clivage des sites AP généré par les ADN glycosylases, particulièrement celles monofonctionnelles. Cette enzyme ubiquitaire est très active et génère la majorité des cassures simple brin produites par la voie du BER, laissant des extrémités 3'OH et 5'dRP (Nakamura and Swenberg, 1999). Ceci suggère donc une bonne coordination d'APE1 avec les étapes suivantes du BER, qui doivent pouvoir prendre en charge ces cassures. En effet, il a été montré que des niveaux élevés d'APE1 en absence de XRCC1 induisent une instabilité du génome, probablement due à un niveau trop important de cassures, et à un BER surpassé (Sossou et al., 2005). Par ailleurs, plusieurs groupes ont essayé, sans succès, de générer des souris KO *Ape1*. Ces résultats mettent en avant le rôle essentiel d'APE1 dans le développement embryonnaire à un stade précoce, puisque ces embryons ne survivent pas au-delà de quelques jours (Meira et al., 2001). L'identification du domaine d'APE1 impliqué dans cette létalité a été l'objet de nombreuses études, fournissant des réponses encore débattues aujourd'hui. Cependant plusieurs études ont montré des lignées viables de souris mutées spécifiquement dans chacun des domaines d'APE1, suggérant que la viabilité des animaux dépend de la fonction de réparation de l'ADN (Ordway et al., 2003; Izumi et al., 2005).

5. La protéine plateforme XRCC1

Une dernière protéine vient s'ajouter à la liste de protéines décrites jusqu'ici : la protéine plateforme XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing protein 1). Cette protéine possède la particularité d'être impliquée à la fois dans la voie du BER et dans la réparation des cassures simple brin (SSBR), sans pour autant posséder d'activité enzymatique (Caldecott, 2003a; Marsin et al., 2003). La fonction d'XRCC1 est basée sur sa capacité à interagir avec de multiples enzymes et intermédiaires de l'ADN dans différentes voies de réparation (Caldecott, 2003a; Nazarkina et al., 2007). Elle servirait donc à coordonner la séquence des activités enzymatiques mises en jeu dans ces différents processus. Les différents domaines responsables des interactions avec les enzymes du BER et du SSBR ont été identifiés. XRCC1 est composé de trois domaines espacés par deux linkers flexibles (Figure II.6) (Abbotts and Wilson III, 2017). Le domaine NTD (N-Terminal Domain) est responsable de l'interaction avec la Pol β (Dianova et al., 2004; Marintchev et al., 2003), le domaine BRCT1 (BRCA1 Carboxyl-Terminal protein interaction domain 1) est impliqué dans l'interaction avec la PARP1 (Masson et al., 1998), et le domaine BRCT2 est nécessaire pour son interaction avec et la stabilisation de la ligase III (Caldecott et al., 1994; Nash et al., 1997). Des mutations en ces différents sites de la protéine entraînent alors une diminution de son recrutement aux cassures simple brin ainsi qu'une diminution du recrutement des enzymes avec lesquelles elle peut interagir. Son interaction avec APE1 (Vidal et al., 2001b) et différentes ADN glycosylases a également été mise en évidence, notamment pour OGG1 (Marsin et al., 2003; Campalans et al., 2015), NTH1 et NEIL2

(Campalans et al., 2005). Une altération de l'interaction entre la Pol β et XRCC1 par l'introduction d'une substitution V86R dans son domaine NTD affecte le recrutement de la Pol β aux sites de dommages, ainsi que le recrutement de facteurs plus tardifs tels que la ligase III (Dianova et al., 2004). De même, le recrutement de la ligase III dans la voie du BER est altéré suite à l'introduction du variant R194W, mutant qui affecte l'interaction entre OGG1 et XRCC1 (Campalans et al., 2015). L'interaction de XRCC1 avec les enzymes du BER à différents niveaux de la voie est donc indispensable à la stabilité et à l'action de la ligase III.

Une caractéristique importante d'XRCC1 est la régulation spatiotemporelle de son recrutement en fonction de la voie de réparation. En effet son recrutement dans la voie des cassures simple brin s'effectue dans les minutes qui suivent l'induction des dommages, tandis que celui observé dans la réparation par le BER est détecté plusieurs heures après la formation des lésions, ce qui est cohérent avec la cinétique de réparation des bases oxydées. De plus les foci contenant XRCC1 sont formés dans des domaines d'euchromatine et d'hétérochromatine lors de la réparation des cassures simple brin. Par contre, ces mêmes foci sont essentiellement formés dans les régions d'euchromatine lorsqu'XRCC1 participe à la voie du BER (Campalans et al., 2013). Cette protéine étant impliquée dans plusieurs voies de réparation, son rôle dans le maintien de la stabilité génétique est donc essentiel.

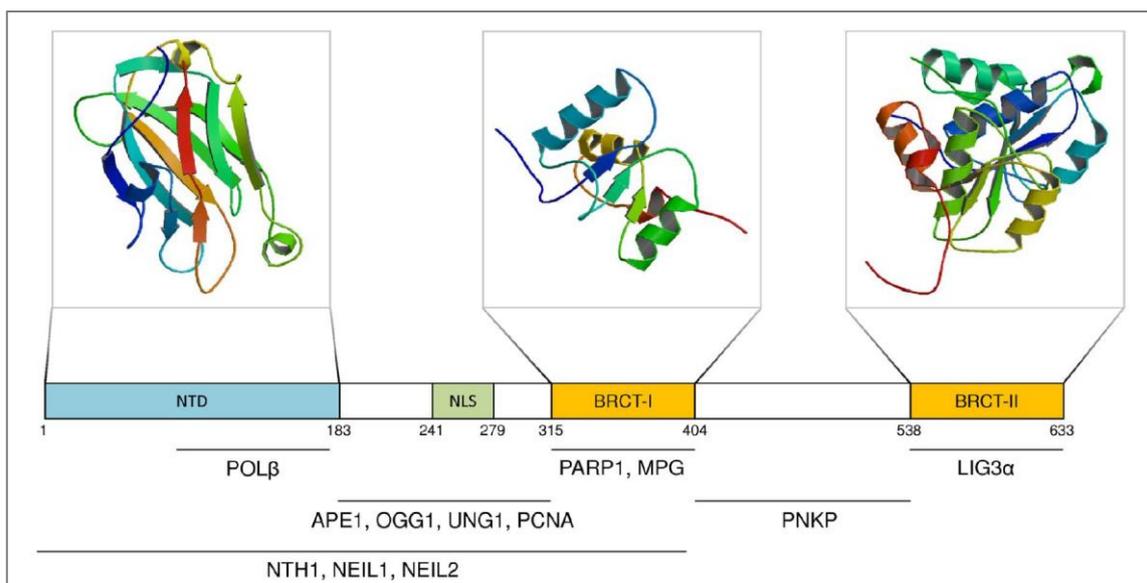


Figure II.6 : Représentation schématique des différents domaines de XRCC1. Les domaines NTD (N-Terminal Domain), BRCT1 et BRCT2 sont séparés par deux linkers flexibles. Les sites d'interactions avec les protéines du BER et du SSBR sont également indiqués pour chaque domaine. NLS : Nuclear Localization Sequence (D'après Abbotts and Wilson, 2017).

Des cellules KO *XRCC1* sont caractérisées par une sensibilité à différents agents génotoxiques, tels que le MMS ou le peroxyde d'hydrogène, ainsi qu'une faible sensibilité aux radiations UV, aux métaux lourds et à certains agents alkylants tels que la mitomycine C (Abbotts and Wilson, 2017). Des résultats similaires ont été observés dans des cellules humaines transfectées par un siRNA contre XRCC1 (Brem and Hall, 2005). Enfin la délétion homozygote du gène *Xrcc1* chez la souris est létale dès le stade embryonnaire, causant un arrêt du développement au stade E6.5 (Brem and Hall, 2005). Ces résultats sont cohérents avec le

rôle essentiel de la protéine XRCC1 dans les voies du BER et du SSBR décrit dans les paragraphes précédents.

II. La réparation des cassures simple brin de l'ADN

Comme évoqué précédemment, les cassures simple brin peuvent être générées indirectement par l'incision d'APE1 ou par l'activité AP-lyase de certaines ADN glycosylases dans la voie du BER. Mais ces cassures peuvent aussi provenir de l'attaque directe des sucres de l'ADN par les ERO (Caldecott, 2003b), ou de l'activité d'enzymes telles que l'ADN topoisomérase 1 (Top1) (Figure II.7A) (Pommier et al., 2003). La réparation de ces cassures simple brin se différencie principalement du BER par les premières étapes de reconnaissance de la cassure. Les cassures simple brin produites indirectement sont prises en charge par la voie du BER décrite précédemment, tandis que celles générées directement suivent la voie du SSBR (Single-Strand Break Repair). La voie du SSBR est généralement considérée comme une « sous-voie » spécialisée du BER, puisque les étapes en aval de la reconnaissance de la cassure sont similaires (Figure II.7C, D et E) (Abbotts and Wilson, 2017). Le SSBR est constitué de 4 étapes : 1) la détection de la cassure simple brin ; 2) le nettoyage des extrémités bloquantes en 5' et/ou 3' ; 3) la synthèse réparatrice du brin ; 4) la ligature des deux extrémités par une ligase (Caldecott, 2014). Deux protéines sont particulièrement importantes dans le SSBR : la PARP1 (Poly(ADP-ribose) Polymerase 1) et XRCC1 (décrite dans la section précédente).

Les cassures simple brin sont détectées par la PARP1 qui se lie rapidement à celles-ci. Cette liaison permet son activation, ce qui se traduit par la synthèse d'une chaîne de poly(ADP-ribose) (autoparolyation de la PARP1, mais d'autres protéines peuvent aussi être modifiées telles que les histones), pouvant être constituée de plusieurs centaines d'unités ADP-ribose (Caldecott, 2014). Cette chaîne est ensuite dégradée par la PARG (Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase), permettant une future réutilisation de la PARP (Davidovic et al., 2001). Comme mentionné précédemment, PARP1 interagit de plus avec XRCC1. Cette interaction permet d'accélérer le SSBR en favorisant le recrutement et l'accumulation de XRCC1, cette protéine pouvant à son tour stabiliser et/ou stimuler plusieurs enzymes communes au BER et au SSBR telles que la Pol β et la ligase III (Caldecott, 2014). Qu'elles soient produites de façon directe ou indirecte, les cassures simple brin qui possèdent des extrémités 5' et/ou 3' anormales doivent être modifiées pour restaurer les extrémités 3'OH et 5'P indispensables aux étapes en aval de la réparation. Différentes protéines sont chargées de cette étape, telles que la PNK (PolyNucleotide Kinase/Phosphatase) ou APE1. Ici encore XRCC1 interagit avec et stimule l'activité de la PNK (Caldecott, 2003b). Les étapes suivantes (synthèse réparatrice et ligature des extrémités) sont similaires à celles décrites dans la voie du BER, qui peuvent évoluer vers une voie dite courte ou longue en fonction du nombre de nucléotides remplacés.

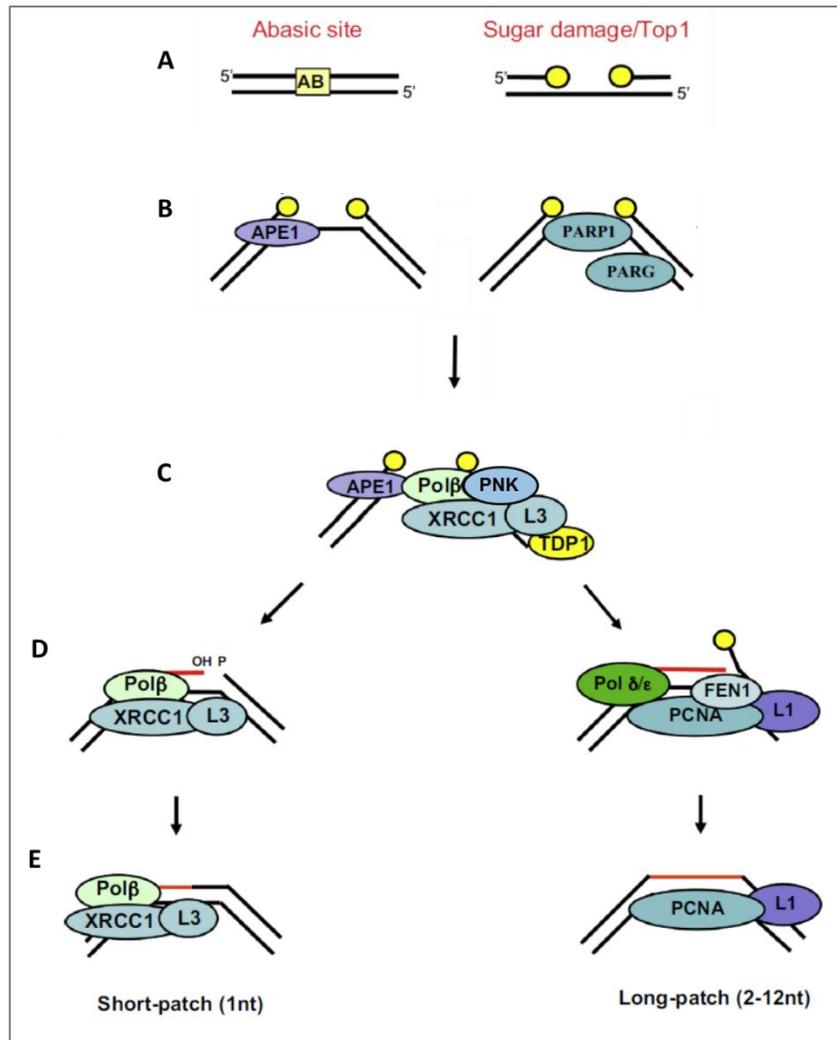


Figure II.7 : Mécanismes de réparation des cassures simple brin. **A.** Les cassures simple brin peuvent être générées indirectement pendant la voie du BER au niveau des sites abasiques suite à l'action d'APE1, ou directement suite à l'attaque des sucres de l'ADN ou par l'action de l'ADN Topoisomérase 1 (Top1). **B.** Dans la voie du SSBR, la PARP1 permet de reconnaître la cassure (partie droite du schéma). Dans la voie du BER, les cassures ne nécessitent pas cette reconnaissance par la PARP1 (partie gauche du schéma). **C.** Les extrémités anormales générées en 5' et 3' de part et d'autre de la cassure sont prises en charge par différentes enzymes en fonction de leur nature. Dans tous les cas, ces enzymes sont complexées à XRCC1. **D et E.** Les étapes suivantes de synthèse réparatrice (**D**) et de ligature des extrémités (**E**) sont communes aux voies du BER et du SSBR et peuvent évoluer vers une voie longue ou courte en fonction du nombre de nucléotides à corriger. L1 : Ligase I ; L3 : Ligase III. TDP1 : Tyrosyl DNA Phosphodiesterase 1 (Adapté d'après Caldecott, 2014).

III. La réparation par excision de nucléotides

La réparation par excision de nucléotides (NER pour Nucleotide Excision Repair) est la seconde voie capable de prendre en charge les modifications de bases. Contrairement au BER, cette voie permet de réparer les lésions volumineuses de l'ADN entraînant une distorsion de la double hélice, majoritairement induites par irradiation UV, mais aussi par des mutagènes environnementaux ou des traitements de chimiothérapie. Les dommages concernent

principalement les pyrimidines (thymine ou cytosine), formant des dimères de pyrimidines (Bukowska and Karwowski, 2018). Le NER se différencie du BER sur un point crucial : un même groupe d'enzymes est capable d'éliminer différentes lésions de l'ADN (Schärer, 2013). Les substrats du NER ne doivent posséder que deux caractéristiques : être volumineux et être capable de déstabiliser la molécule d'ADN.

Le NER peut être divisé en deux sous-voies : la voie globale du NER (GG-NER pour Global Genome NER) et la voie du NER couplée à la transcription (TC-NER pour Transcription-Coupled NER). La voie GG-NER est active dans l'ensemble du génome, tandis que le TC-NER répare les lésions dans les gènes dits actifs. En réalité ces deux sous-voies ne se différencient que dans les premières étapes du NER, c'est-à-dire dans les étapes de reconnaissance de la lésion. Le GG-NER nécessite principalement une protéine pour la reconnaissance de la lésion : XPC (Xeroderma Pigmentosum complementation group C) (Figure II.8). Dans le GG-NER, indépendamment de la transcription, la lésion est donc reconnue par un complexe clé, XPC-RAD23B, appelé « senseur de dommage », qui lie le brin non endommagé opposé à la lésion (Figure II.8). Dans le TC-NER, à l'inverse, la lésion est immédiatement reconnue lorsque l'ARN polymérase reste bloquée au site de dommage pendant l'élongation de la transcription. L'ARN polymérase interagit avec différents facteurs : UVSSA (UV-Stimulated Scaffold protein A), USP7 (Ubiquitin-Specific-Processing protease 7), et CSA (Cockayne Syndrome protein A). CSA se complexe à CSB permettant le retour en arrière de l'ARN polymérase. Cette étape laisserait la place nécessaire à la réparation par la suite du complexe NER (Bukowska and Karwowski, 2018).

Le TC-NER et le GG-NER convergent lorsque le facteur TFIIH est recruté sur le site de réparation. TFIIH est un complexe impliqué dans l'initiation de la transcription, composé de dix protéines. Deux d'entre elles sont des ATPases/hélicases, XPB et XPD. Seule l'activité ATPase de XPB est nécessaire au NER, tandis que les deux activités ATPase/hélicase de XPD sont requises (Spivak, 2015). XPB et XPD déroulent l'ADN pour créer une bulle de 20 à 30 nucléotides. Une fois ce complexe de pré-incision en place, les protéines XPA, RPA et XPG sont recrutées. XPA lie l'ADN du côté 5' de la bulle, où elle interagit avec TFIIH, RPA, PCNA, XPC, DDB2 et ERCC1-XPF. RPA se lie avec l'ADN simple brin opposé à la lésion, le protégeant de la dégradation (Schärer, 2013). XPG s'associe avec TFIIH mais son activité endonucléase n'est déclenchée que lorsque ERCC1-XPF est recrutée par XPA à l'extrémité 5' (Spivak, 2015). Ce recrutement permet l'incision du brin d'ADN en 5' grâce à l'activité endonucléase de XPF. La machinerie de réplication, composée des polymérases δ/ϵ et des protéines PCNA-RFC-RPA, synthétise ensuite plusieurs nucléotides, déplaçant ainsi le brin endommagé et TFIIH. La Pol ϵ est active dans les cellules en réplication, tandis que la Pol δ agit principalement dans les cellules quiescentes (Lehmann, 2011). Cette synthèse est suivie par l'incision de l'ADN en 3' par l'endonucléase XPG. Les extrémités du brin d'ADN sont enfin ligaturées par la ligase I dans les cellules en réplication, ou la ligase III, aidée de son cofacteur XRCC1, dans les cellules quiescentes (Schärer, 2013).

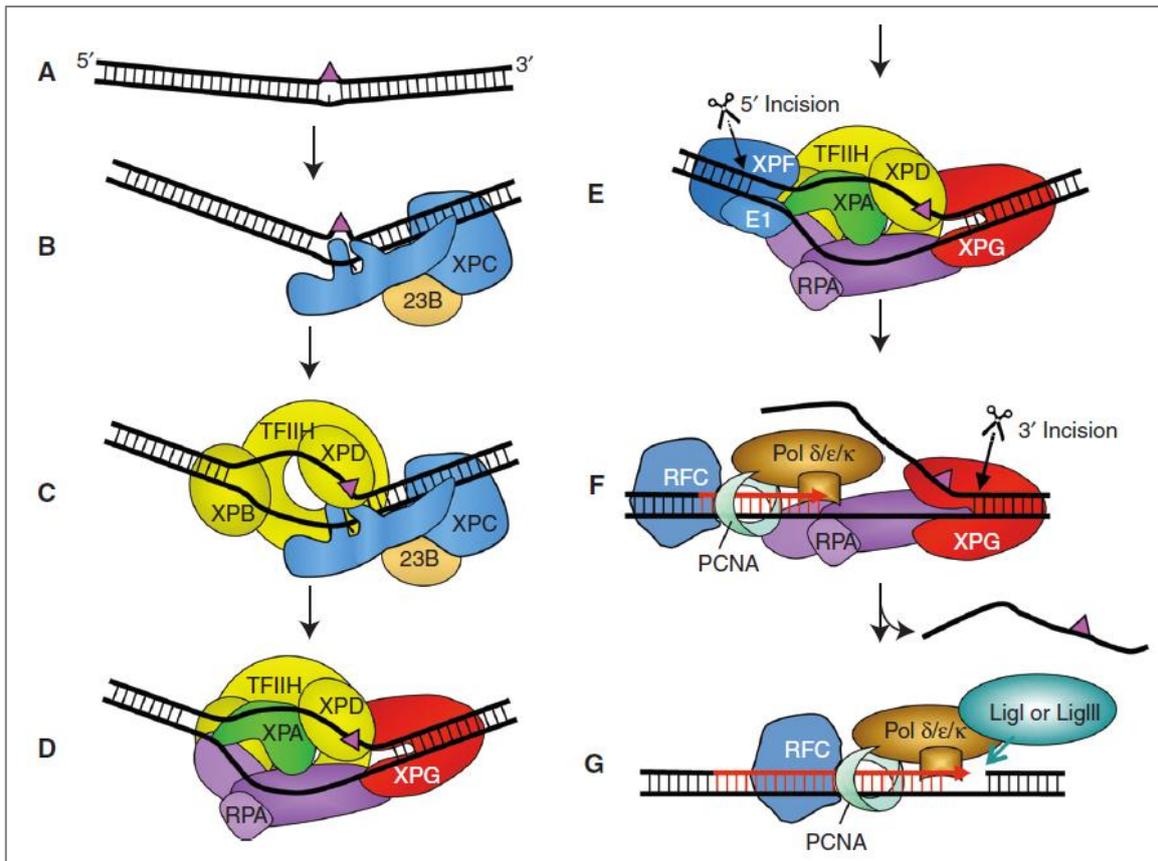


Figure II.8 : Mécanisme général de la réparation par excision de nucléotide. (A) Les modifications volumineuses de bases entraînant une distorsion de la double hélice d'ADN sont réparées par la voie du NER. (B) Dans la voie globale du NER les lésions sont reconnues par XPC-RAD23B. (C) TFIIH interagit avec ce complexe. Ceci entraîne l'ouverture de l'ADN avec XPB, permettant à XPD de scanner l'ADN et de trouver la lésion. (D) L'arrêt de XPD sur la lésion permet la formation du complexe de pré-incision grâce au recrutement de XPA, RPA et XPG. (E) Le recrutement de ERCC1-XPF via l'interaction avec XPA entraîne l'incision en 5' de la lésion. (F) Initiation de la synthèse réparatrice par Pol δ, Pol κ ou Pol ε, suivie de l'incision en 3' par XPG. (G) Ligature du brin d'ADN par la ligase I ou III (D'après Schäfer, 2013).

Le NER peut également servir de système de secours à la voie du BER, participant à l'excision de lésions telles que la 8-oxoG ou les thymines glycols (Reardon et al., 1997). Une étude utilisant la microscopie en temps réel a montré le recrutement de deux protéines du NER, CSB et XPC, après induction de dommages oxydatifs par micro-irradiation laser. La principale lésion induite était la 8-oxoG, comme l'attestait le co-recrutement d'OGG1. L'absence d'observation de facteurs impliqués dans les étapes plus tardives du NER indiquait un rôle de ces protéines indépendant de cette voie de réparation, qui serait donc spécifique au BER (Menoni et al., 2012a). Une association entre CSB et OGG1 a également été observée, particulièrement après irradiation. Cependant aucune interaction directe entre les deux protéines n'a été détectée (Tuo et al., 2002). XPC agirait quant à lui comme un cofacteur dans la réparation de la 8-oxoG en stimulant l'activité d'OGG1. Les auteurs proposent un mécanisme où XPC favoriserait la liaison et le renouvellement d'OGG1 (D'Errico et al., 2006). D'autres études ont montré la collaboration de protéines du NER dans la réparation des lésions par le BER. A titre d'exemple, on peut citer l'activation de l'ADN glycosylase NTH1 par XPG

(Klungland et al., 1999), et l'interaction de CSB avec NEIL1 (Muftuoglu et al., 2009) et APE1 (Wong et al., 2007), conduisant à leur activation. Ces résultats, et bien d'autres, mettent en avant de multiples réactions croisées entre les différentes voies de réparation. Cependant les interactions observées entre le BER et le NER concernent des protéines du NER impliquées à la fois dans le TCR-NER (tel que CSB) et le GG-NER (tel que XPC). Or ces deux sous-voies se différencient principalement par leur coordination ou non avec la transcription. A ce stade, il semble donc difficile de savoir si l'implication de ces protéines dans la réparation des dommages oxydatifs pourrait être liée ou non au processus de transcription.

IV. La réparation des cassures double brin de l'ADN

Les lésions de l'ADN ne concernent pas uniquement les modifications de bases. Les cassures double brin (CDB) peuvent déclencher l'arrêt du cycle cellulaire, la mort cellulaire et générer de nombreuses altérations génétiques à l'origine du processus de cancérogenèse. C'est pourquoi elles sont considérées comme les lésions les plus létales pour l'organisme (Pandey and Raghavan, 2017). Le réseau de signaux qui constitue la DDR (DNA Damage Response) active un ensemble de mécanismes permettant d'arrêter le cycle cellulaire (à travers des points de contrôle) et de réparer les dommages créés. Les CDB sont détectées par des senseurs, ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM-Rad3-related). Le couple ATM/ATR, avec l'aide d'autres Médiateurs tels que BRCA1 (Breast Cancer-Associated protein 1), 53BP1 et MDC1, transmettent les signaux reçus à des points de contrôle, généralement des kinases. Ces points de contrôle peuvent alors activer ou désactiver des effecteurs tels que p53 (Ciccia and Elledge, 2010).

L'ensemble de ces signaux peuvent déclencher l'activation des voies de réparation. Les cellules mammifères utilisent deux voies majeures pour la réparation des CDB : la recombinaison homologue (RH) ou la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ pour Non Homologous End Joining) (Figure II.9). Le NHEJ opère principalement en phase G1 du cycle cellulaire en réparant les CDB sans utiliser d'homologie de séquence. La RH à l'inverse agit dans les phases S et G2 du cycle, et utilise la chromatide sœur du chromosome homologue comme modèle pour réparer la cassure. Ce faisant, la RH permet de restaurer la séquence génomique initiale (Ciccia and Elledge, 2010).

La RH nécessite donc les deux chromatides sœurs des deux chromosomes homologues. Les CDB sont réséquées en leur extrémité 5' par un complexe de protéines composé de MRE11, RAD50, NSB1 (complexe MRN), hExo1 et CtIP. RPA puis RAD51 se lie à la molécule d'ADN. Le filament d'ADN recouvert de RAD51 forme alors un complexe appelé filament pré-synaptique. Cette étape est suivie par l'invasion du brin, partant à la recherche d'une homologie. Le simple brin portant RAD51 s'apparie avec le brin complémentaire du chromosome homologue, ce qui déplace la structure de ce dernier, formant une boucle d'ADN dite « boucle D ». La synthèse de l'ADN simple brin par la polymérase δ utilise le brin complémentaire comme modèle. Une fois les deux brins re-synthétisés, la liaison de l'ADN par la ligase I permet enfin de restaurer l'intégrité des deux brins en ligaturant les extrémités (Figure II.9A) (Heyer et al., 2010).

Le NHEJ ressoude directement les extrémités non-homologues de la lésion. Cette voie n'utilisant pas de séquence d'homologie pour la réparation, elle est généralement associée à une perte d'information génétique (Bunting and Nussenzweig, 2013). La première protéine à se lier à la cassure est Ku70/80, qui agit comme une plateforme pour le recrutement d'autres protéines, telles que les protéines PKC et artémis. Ces protéines prennent en charge les extrémités de l'ADN lésé grâce à l'activité nucléase de la protéine artémis. La synthèse des brins d'ADN est ensuite assurée par les polymérase λ et μ . L'étape finale de ligature des extrémités est enfin réalisée par le complexe ligase IV / XRCC4 / XLF (XRCC4-Like Factor). Récemment une nouvelle protéine, PAXX (PARalog of XRCC4 and XLF), a été identifiée. PAXX serait recrutée au site de CDB et favoriserait la liaison d'autres facteurs du NHEJ (Figure II.9B) (Bunting and Nussenzweig, 2013; Pandey and Raghavan, 2017).

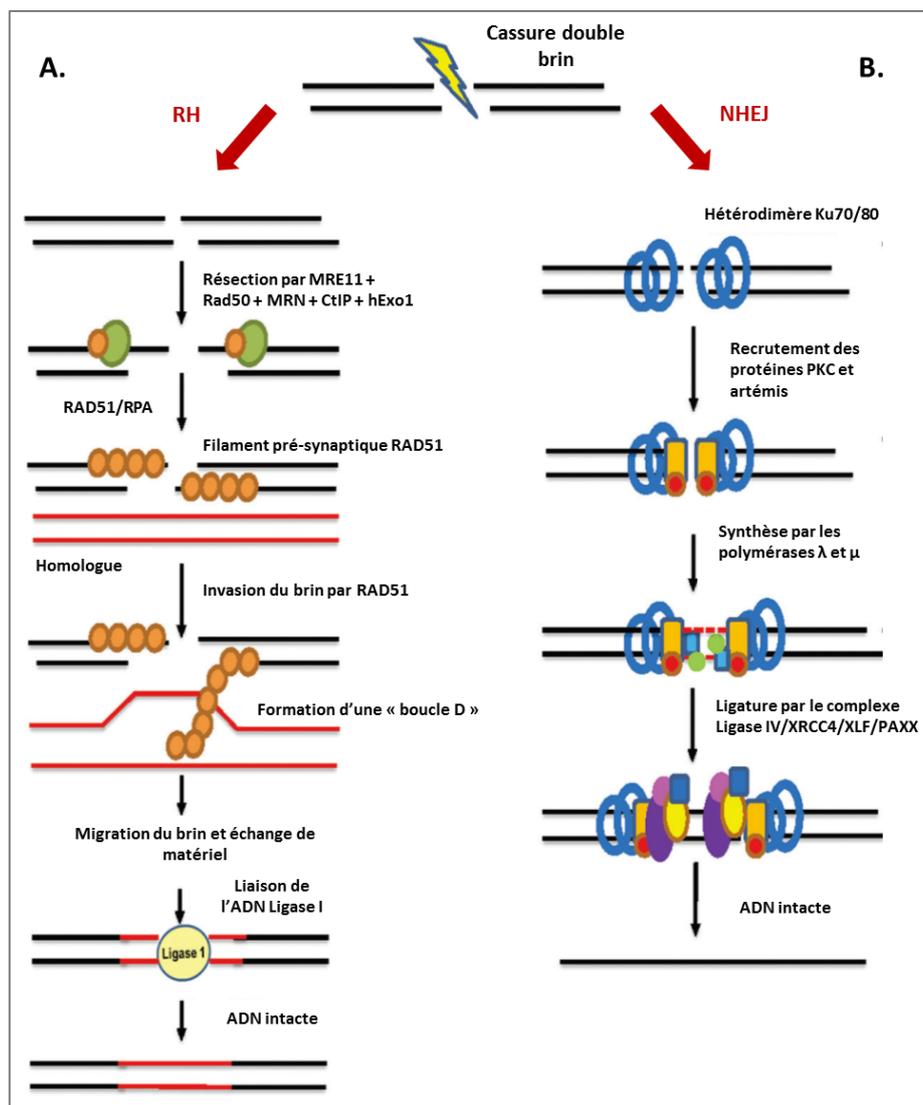


Figure II.9 : Mécanismes de réparation des cassures double brin. Les cassures double brin (CDB) peuvent être réparées par la RH ou le NHEJ. La RH permet de préserver l'information génétique en utilisant le chromosome homologue comme modèle. Le NHEJ répare directement les cassures en soudant les extrémités non-homologues (Adapté d'après Pandey and Raghavan, 2017).

V. Conclusion générale du chapitre II

Ce chapitre a permis de présenter les grandes voies de réparation utilisées par la cellule lorsque son ADN est endommagé. Parmi ces mécanismes nous nous intéressons particulièrement à la voie du BER, et plus spécifiquement aux étapes initiales de reconnaissance et d'excision de la lésion. Comment les ADN glycosylases, qui initient le BER, sont-elles capables de reconnaître la lésion au sein de l'environnement cellulaire ? Ces enzymes possèdent-elles une dynamique propre en fonction de la lésion reconnue ? Et quels mécanismes permettent de déclencher et de réguler le recrutement de ces enzymes jusqu'à leur substrat ? Ces questions font l'objet d'intenses recherches depuis des dizaines d'années et ces deux dernières décennies ont déjà permis d'apporter de nombreuses réponses. On sait notamment que certaines enzymes sont recrutées dans des régions spécifiques du noyau après l'induction des dommages, comme c'est le cas de l'enzyme OGG1 dans les domaines d'euchromatine (Amouroux et al., 2010). Cependant de nombreuses informations sont encore manquantes pour pleinement comprendre le mécanisme d'action de ces protéines, et par conséquent pour savoir comment utiliser ces données à des fins diagnostiques ou thérapeutiques.

Les mécanismes de réparation de l'ADN, qui ont principalement lieu dans le noyau de la cellule, sont coordonnés avec de multiples processus essentiels, tels que la réplication et la transcription. Or tous ces mécanismes ont un point commun : ils interviennent toujours au niveau de la molécule d'ADN, elle-même organisée de façon très hétérogène dans le compartiment nucléaire. Le chapitre suivant a pour objectif de décrire l'organisation du noyau ainsi que les acteurs qui le composent. Ces éléments sont en effet indispensables pour comprendre dans quel contexte les protéines de réparation, dont OGG1, évoluent au sein du noyau de la cellule.

Chapitre III - Organisation nucléaire

I. Organisation de l'ADN

Chez tous les organismes eucaryotes, de la levure à l'homme, l'ADN est empaqueté dans les cellules dans un compartiment bien défini, le noyau, séparé du cytoplasme environnant par une double membrane. Le noyau contient les chromosomes et représente le siège de processus essentiels de la cellule, tels que la réplication, la transcription, la réparation, ou la maturation des sous-unités ribosomales.

1. Les degrés de compaction de l'ADN

La cellule eucaryote renferme son information génétique dans des molécules d'ADN qui peuvent mesurer jusqu'à 1m de long (Figure III.1A). Or l'ADN doit pouvoir être contenu dans le noyau de la cellule, lui-même d'une taille de l'ordre du micromètre. Pour se faire, l'ADN des eucaryotes est chargé de nombreuses protéines, et l'ensemble forme le complexe de la chromatine, fortement compactée dans le noyau et chargée de contrôler l'activité des gènes. La sous-unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome, permettant d'enrouler environ 147 pb d'ADN en 1.65 tours autour d'un octamère d'histones, lui-même composé des histones H2A, H2B, H3 et H4 (chacune étant présente en deux exemplaires). Cette structure permet un premier degré de compaction (Kornberg, 1974). L'ADN ainsi enroulé autour de l'octamère est partiellement accessible aux protéines de régulation. Chaque nucléosome est connecté à son voisin par un court segment d'ADN libre de 10 à 80 pb, formant une structure en « collier de perles » ou fibre nucléosomique (Figure III.1B). Ce polynucléosome est replié en une fibre compacte (fibre chromatinienne) d'un diamètre de 30 nm, formant un solénoïde avec 6 nucléosomes par tour, et donnant un ADN 100 fois plus compacté qu'à l'origine (Figure III.1C). La fibre de 30 nm est stabilisée par la liaison d'une cinquième histone, le « linker » H1 (Bednar et al., 1998). Les degrés de compaction suivants (niveaux intermédiaires de compaction présentés entre les Figures III.1C et 1D) permettent aux chromosomes d'être suffisamment condensés pour entrer dans le processus mitotique (ADN compacté jusqu'à 100 000 fois en mitose) (Figure III.1D). Dans les cellules en division la chromatine est ultra-condensée, ce qui permet de visualiser individuellement les chromosomes compacts. A l'inverse, dans les cellules en interphase, la chromatine est distribuée dans tout le noyau et organisée en régions condensées (hétérochromatine) et moins condensées, plus ouvertes (euchromatine).

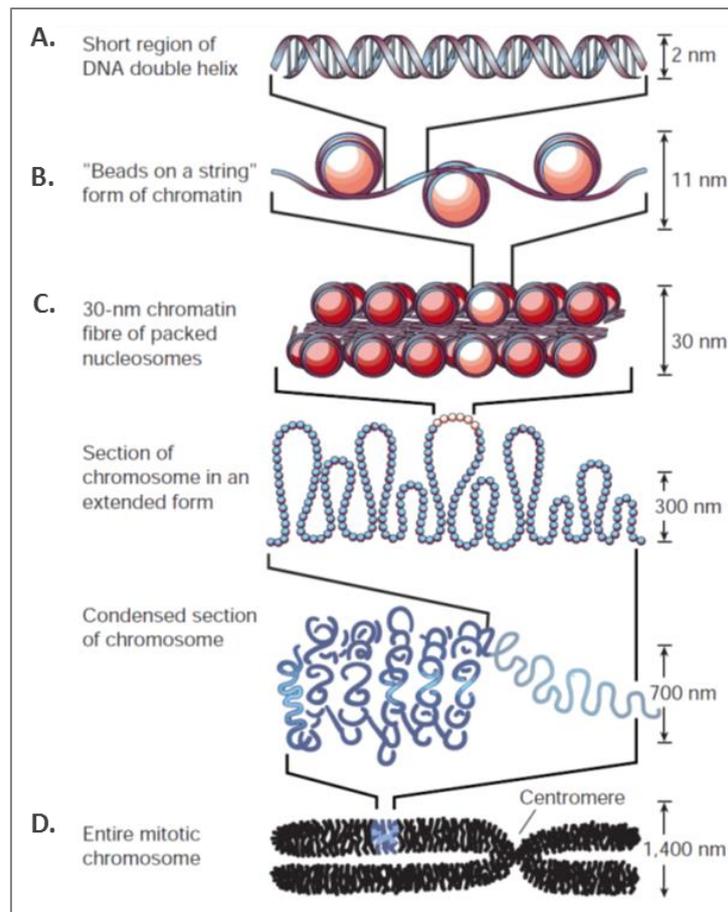


Figure III.1 : Les différents degrés de compaction de la chromatine. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 permettent la formation des nucléosomes, organisés en forme de collier de perles d'un diamètre de 11 nm (B). L'histone de liaison H1 établit des contacts inter-histones et histone-ADN, favorisant la formation d'une fibre compacte de 30 nm de diamètre (C). La chromatine peut ensuite se condenser davantage, compaction nécessaire à l'organisation des chromosomes mitotiques (D) (D'après Felsenfeld and Groudine, 2003).

2. Les histones

a. Structure des histones

Les histones représentent les composants protéiques de la chromatine. Nous avons vu que cette famille de protéines est composée des histones H2A, H2B, H3, H4, et du « linker » H1. Chaque histone contient deux domaines fonctionnels bien distincts. Les histones possèdent tout d'abord une queue N-terminale de taille variable, sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT). La queue de l'histone joue un rôle important dans la stabilité du nucléosome, et pourrait contribuer à l'état condensé de la fibre de chromatine. Le second domaine, central (histone-fold domain), est composé de trois hélices α connectées par deux boucles, et permet les contacts histone – histone ou histone – ADN au sein du nucléosome (Arents and Moudrianakis, 1995).

L'analyse de la structure cristalline du nucléosome déterminée à une résolution de 2,8 Å a permis de révéler les détails moléculaires du nucléosome, en particulier les interactions qui ont lieu entre chaque histone (Luger et al., 1997). Les histones H3 et H4 forment un tétramère (H3-H4)₂, tandis que les histones H2A et H2B forment deux dimères, qui interagissent avec le tétramère H3-H4, via deux associations H2B-H4. L'histone H4 établit donc des contacts étroits avec les trois autres histones du cœur du nucléosome. L'ensemble de ces histones forme un octamère qui est assemblé en présence d'ADN et de fortes concentrations de sels. Les queues des quatre histones apparaissent comme des structures en désordre qui partent du centre du nucléosome. La queue N-terminale de l'histone H4 a également des interactions inter-nucléosome avec l'histone H2A (via une de ses hélices α), ce qui pourrait stabiliser les structures de compaction supérieure.

La composition, la structure et la localisation des nucléosomes peuvent être modifiées par les complexes de remodelage, composés des modificateurs d'histones et des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants, entraînant l'assemblage et le désassemblage du nucléosome. De plus, la fibre de chromatine peut être modifiée par l'incorporation de variants d'histone.

b. Variants d'histones

Les gènes codant les protéines histones sont majoritairement exprimés pendant la phase S du cycle cellulaire. A l'inverse, les variants d'histones H2A et H3 sont exprimés tout au long du cycle cellulaire, et leur expression n'est donc pas restreinte à la phase S (Biterge and Schneider, 2014).

L'histone H2A est celle qui possède le plus grand nombre de variants connus. Ces variants incluent les histones H2AX et H2AZ, identifiés chez la plupart des organismes eucaryotes, ainsi que les variants H2ABbd et MacroH2A, uniquement présents chez les vertébrés. Les variants H2A sont caractérisés par leur séquence C-terminale divergente de celle d'origine, ainsi que par leur localisation dans le génome (Marino-Ramirez et al., 2005). H2AZ serait impliqué dans l'activation de la transcription chez la levure en prévenant la propagation de l'hétérochromatine. H2AX est caractérisé par une extension en C-terminal qui possède un résidu serine pouvant être phosphorylé par les kinases ATM et ATR en réponse à des cassures doubles brins. Cette phosphorylation de H2AX, aboutissant à la forme γ -H2AX, intervient dans le recrutement des protéines impliquées dans la réparation des CDB, et interagit notamment avec NBS1, 53BP1 et MDC1 (Fernandez-Capetillo et al., 2004).

L'histone H3 possède 4 variants, H3.1, H3.2, H3.3 et CENP-A. Les formes H3.1 et H3.2 sont des formes canoniques de H3, fortement exprimées pendant la phase S et incorporées dans l'ADN pendant la réplication. H3.2 et H3.3 diffèrent de la forme H3.1 par un ou cinq acides aminés respectivement. La forme H3.3 est retrouvée dans la chromatine transcriptionnellement active où elle peut remplacer H3.1, et peut être incorporée dans la chromatine en dehors de la phase S. Le dernier variant, CENP-A, est exclusivement localisé au niveau des centromères, où il permet l'assemblage correct des kinétochores pendant la mitose (Biterge and Schneider, 2014).

c. Modifications post-traductionnelles des histones

Les MPT sont des facteurs importants de l'épigénome. En modifiant les protéines associées à l'ADN, ces processus agissent comme des interrupteurs de la régulation des gènes.

Les nucléosomes peuvent subir différents types de modifications chimiques, soit au niveau de leurs queues qui s'étendent à partir du centre, soit à l'intérieur de l'octamère (Goll and Bestor, 2002). Les modifications des acides aminés peuvent être de différente nature (Figure III.2). Les résidus lysine peuvent être acétylés, méthylés, ou couplés à l'ubiquitine. Les résidus arginine peuvent aussi être méthylés, et les résidus sérine peuvent être phosphorylés. Toutes les modifications peuvent s'influencer mutuellement, et sont souvent corrélées les unes avec les autres. Par exemple, la méthylation de H3 en K4 et K79, catalysée par deux méthylases distinctes, requiert au préalable l'ubiquitination de H2B en K120. Considérées dans leur ensemble, les MPT constituent un ensemble de marqueurs qui reflète l'état local du matériel génétique concerné, qui a été qualifié de « code des histones ». Ces modifications sont donc associées à des profils distincts d'expression des gènes, de réparation de l'ADN, et de réplication (Strahl and Allis, 2000).

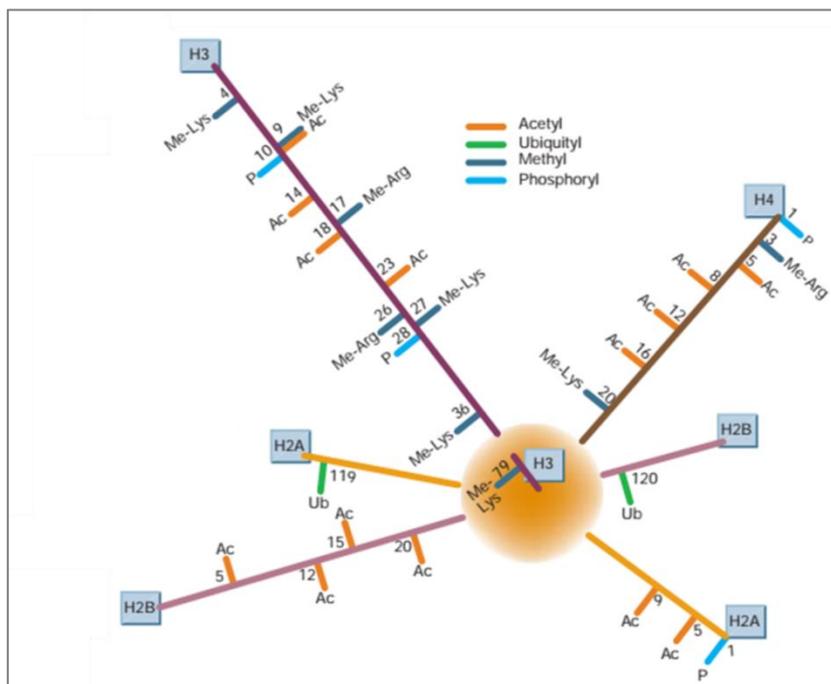


Figure III.2 : Modifications connues des histones. Chaque modification est codée par une couleur, comme indiqué sur le schéma. La position de l'acide aminé modifié dans chaque histone est indiquée par un chiffre (D'après Felsenfeld and Groudine, 2003).

La modification des histones est un processus dynamique et réversible, qui permet continuellement de changer l'état de ces protéines en fonction du besoin cellulaire. Ces MPT peuvent par exemple influencer l'état de compaction de la chromatine. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence qu'une hyperacétylation des nucléosomes est associée à une

décompaction de la chromatine, elle-même associée à une transcription active des gènes. Ceci peut facilement s'expliquer par le fait qu'une acétylation perturbe la charge normalement positive du résidu lysine, ce qui diminue l'affinité de l'histone pour l'ADN, lui-même étant chargé négativement. La chromatine présente autour des gènes transcriptionnellement actifs est donc enrichie en histones acétylées. Les enzymes responsables de l'acétylation et de la désacétylation sont souvent recrutées sur les gènes qui doivent être activés ou réprimés respectivement, et le passage d'un état à l'autre se fait très rapidement. Une mutation du résidu lysine 16 de l'histone H4 (H4K16), empêchant son acétylation, entraîne par exemple un défaut de transcription d'une centaine de gènes (Dion et al., 2005). Des acétylations de l'histone H3 sont également associées à des régions transcrites. Les acétylations en K56 et K122 sont ainsi préférentiellement enrichies au niveau de gènes actifs (Xu et al., 2005; Tropberger et al., 2013). La méthylation de certains résidus peut également être importante pour l'activation ou l'inactivation d'un gène en fonction des histones concernées (Felsenfeld and Groudine, 2003).

d. Dynamique des histones et réparation

Comme nous l'avons vu précédemment, le génome subit continuellement des attaques endogènes et exogènes, qui génèrent une grande variété de lésions dans l'ADN (Chapitre I). Ces lésions sont réparées par des voies spécifiques du type de lésion. Or, les protéines de réparation opèrent dans un environnement où la chromatine est plus ou moins compacte, et doivent donc pouvoir accéder aux lésions à réparer. En effet l'ADN sous sa forme compacte restreint l'accès des facteurs de réparation, surtout au niveau de l'hétérochromatine. C'est dans ce contexte qu'a été établi le modèle « Accès-Réparation-Restauration », ou modèle ARR.

i. Historique des modèles de remodelage de la chromatine

En 1978, Smerdon et Liberman ont observé pour la première fois un remodelage de la chromatine suite à une irradiation par des UVC dans des fibroblastes humains. Dans cette étude, les régions d'ADN lésées étaient plus sensibles à la digestion par des nucléases que les régions non irradiées. Leur première interprétation était que la réparation des lésions avait davantage lieu dans des régions où la chromatine est accessible aux nucléases, suggérant une distribution non homogène du NER dans le génome. Cependant, les auteurs avaient aussi observé que les régions irradiées récupéraient une résistance aux nucléases au cours du temps, suggérant une modification de la chromatine suite à une irradiation par des UVC (Smerdon and Lieberman, 1978). Peu de temps après, il a été montré que l'augmentation de la sensibilité aux nucléases des régions irradiées par UVC était indépendante de la distribution initiale des lésions dans la chromatine (Zolan et al., 1982). Ces données favorisent l'hypothèse d'un déploiement de la chromatine faisant suite à l'action des UVC, plutôt qu'une réparation par le NER uniquement dans les régions où la chromatine est accessible. Toutes ces études, et bien d'autres, ont permis d'établir un premier modèle de « déploiement-repliement » de la chromatine en réponse aux dommages à l'ADN.

Des études supplémentaires ont complété ce premier modèle. Le déploiement rapide des nucléosomes dans les premières heures après induction des lésions est suivi par une phase plus lente, correspondant au repositionnement des nucléosomes au sein des régions réparées (Smerdon, 1991). Le modèle initialement décrit est alors devenu le modèle « déploiement-repliement-repositionnement ». Une décennie plus tard, Green et Almouzni ont développé le modèle « Accès-Réparation-Restauration », où l'ouverture transitoire de la chromatine induite par la mobilisation des nucléosomes permet aux facteurs de réparation d'accéder aux lésions générées dans l'ADN (Green and Almouzni, 2002). Une fois la réparation achevée, l'organisation d'origine de la chromatine est alors rétablie. Ce modèle introduit aussi la participation d'autres protéines, telles que les protéines chaperones, les remodeleurs de la chromatine, et les modificateurs d'histone. Ce dernier modèle a encore été complété en 2007, montrant l'incorporation de nouvelles histones pendant la phase de restauration, ce qui permet un certain degré de plasticité dans le maintien du génome suite aux dommages de l'ADN (Groth et al., 2007).

La dernière version du modèle de remodelage décrite en 2012 intègre une dynamique de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN qui va du nucléosome à des structures supérieures telles que l'hétérochromatine (Figure III.3) (Soria et al., 2012). Ce modèle intègre alors 4 étapes : Accès – Initiation – Réparation – Restauration (modèle AIRR).

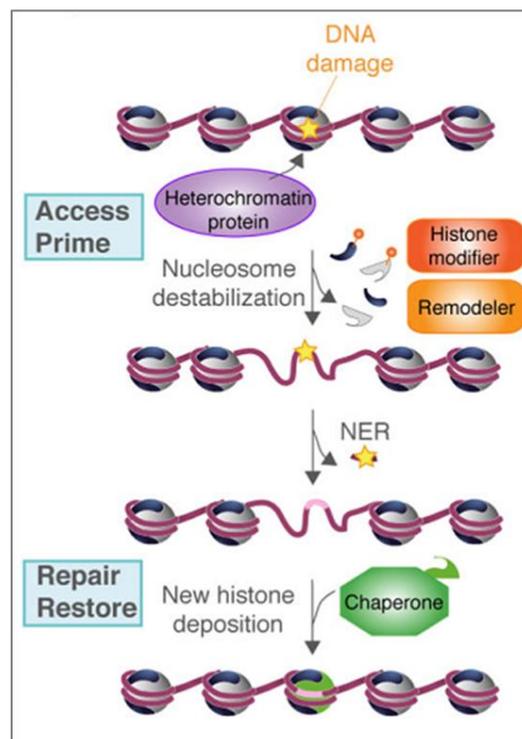


Figure III.3 : Modèle « Accès-Initiation-Réparation-Restauration ». L'ADN est représenté en violet, la réparation de la lésion en rose, les enzymes de modification des histones en orange, le cœur des histones en gris et noir et les nouvelles histones synthétisées en vert (D'après Polo and Almouzni, 2015).

ii. Mobilité des histones et réparation

La première étape du modèle AIRR nécessite une forte mobilité des histones (qui sont faiblement mobiles en temps normal), suite à une déstabilisation des nucléosomes. En effet, la relocalisation des nucléosomes suite à un stress a pu être observée dans la réparation des CDB ainsi que dans la voie de réparation du NER. Par exemple, des études de co-immunoprécipitation ont révélé une perte des histones du cœur sur une région de 3 kilobases autour d'une CDB (Goldstein et al., 2013). De façon similaire, une réduction locale de la densité du cœur de l'histone et du linker a pu être observée au niveau des sites de lésions induites par UVC dans les cellules humaines (Luijsterburg et al., 2012). Des modifications de la mobilité des variants peuvent également avoir lieu. Ceci est particulièrement vrai pour le variant H2AX, dont la mobilité a été montrée suite à l'induction de CDB par micro-irradiation (Ikura et al., 2007). Cette désorganisation des nucléosomes est une réponse précoce et transitoire à un stress génotoxique, qui a lieu dans les 30 premières minutes qui suivent l'application du stress. Le niveau d'histones autour d'une CDB revient à un niveau normal environ 2 heures après l'induction de dommages (Goldstein et al., 2013). Le dernier modèle AIRR met en avant l'incorporation d'histones nouvellement synthétisées au cours de l'étape de restauration. Ces dernières années, la remarquable évolution des techniques *in vivo*, telle que la microscopie en temps réel, a permis de discriminer les histones parentales des nouvelles histones. Ainsi différentes études ont révélé l'incorporation d'histones H3.1, H2A et H2B nouvellement synthétisées dans les régions irradiées par des UVC (Polo et al., 2006; Dinant et al., 2013).

iii. Remodeleurs de la chromatine et réparation

Les remodeleurs utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour perturber les interactions histone – ADN, favorisant le glissement des nucléosomes, le retrait ou l'échange d'histones. Les remodeleurs peuvent se classer en deux familles distinctes : les modificateurs d'histones (par exemple les HAT, pour Histones AcétylTransférases), et les remodeleurs de la chromatine (par exemple les complexes de type SWI/SNF), dépendants de l'ATP. Ces deux types d'enzymes agissent de façon synergique afin de créer une région de chromatine permissive locale.

Le niveau d'acétylation des histones résulte d'un équilibre régulé par deux types d'enzymes : les HAT, qui ajoutent un groupement acétyl et décondensent la chromatine, et les Histones désacétylases (HDAC), qui catalysent la réaction inverse, ce qui recondense la chromatine (Horn and Peterson, 2002). Plusieurs classifications des HAT ont été proposées. L'une définit deux classes en fonction de leur origine et de leur localisation (type A et type B). L'autre propose une organisation en 4 familles : la famille GNAT (GCN5, PCAF, HAT1, ELP3 et HPA2) ; la famille p300/CBP (p300 et CBP) ; la famille MYST (ESA1, MOF, Sas2, Sas3, MORF, Tip60 et HBO1) ; et enfin la protéine RTT109 (Chrun et al., 2017). Chaque HAT est spécifique d'une d'histone et d'un site à acétyler. D'autre part, chaque fonction cellulaire nécessite un ensemble d'acétylations spécifiques à des sites donnés. Dix-huit HDAC ont également été identifiées (Chrun et al., 2017).

Les remodeleurs de type SWI/SNF nécessitent également l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour perturber les interactions histone – ADN au sein du nucléosome. Chaque complexe de remodeleurs possède donc au moins une protéine avec une activité ATPase, qui produit l'énergie nécessaire. La plupart de ces complexes sont des membres de la famille SWI/SNF, connue comme SWI/SNF et RSC chez la levure, ainsi que BAF et PBAF chez l'homme. Chez ces derniers, les complexes sont composés de 12 à 15 sous-unités (Pulice and Kadoch, 2016). Ces complexes remodeleurs diffèrent par leur mécanisme d'action, c'est-à-dire la façon dont ils altèrent la structure du nucléosome. Ils s'associent également avec des co-facteurs qui leur permettent de se lier spécifiquement avec d'autres protéines régulatrices, elles-mêmes liées à des sites spécifiques de l'ADN (Felsenfeld and Groudine, 2003).

Toutes les familles de remodeleurs impliquées dans la réponse au stress sont recrutées sur la chromatine endommagée et contribuent à la réparation de la lésion. A titre d'exemple, on peut citer le rôle du complexe Tip60-p400, qui favorise le déplacement de l'histone H3 des CDB (Courilleau et al., 2012). Les remodeleurs BRG1 (BRG1 étant une sous-unité commune aux complexes BAF et PBAF) et INO80 favorisent également l'accès à la chromatine après irradiation UV dans les cellules humaines (Jiang et al., 2010). Cependant, on ne sait toujours pas aujourd'hui si leur activité de remodelage est limitée à la zone qui doit être réparée ou si elle s'étend à l'ensemble du noyau.

La compaction de la chromatine représente également une barrière pour la réparation des dommages par le BER. Il a initialement été montré que l'activité enzymatique des protéines OGG1, APE1 et Pol β était fortement réduite au sein des nucléosomes. Les remodeleurs SWI/SNF permettaient de stimuler chacune des étapes du BER, dont les efficacités deviennent proches de celles observées avec un ADN nu (Menoni et al., 2007). L'activité d'OGG1 vis-à-vis de la 8-oxoG a ensuite été mesurée, soit au sein d'un nucléosome, soit au centre d'un fragment d'ADN faisant la liaison entre deux nucléosomes. Comme attendu, les lésions 8-oxoG au sein du nucléosome étaient inaccessibles à la protéine OGG1 (Menoni et al., 2012b). De plus, un lien entre OGG1 et certains remodeleurs de la chromatine a récemment été montré *in vivo*. Par exemple, le recrutement du remodeleur CSB (protéine qui appartient à la famille SWI/SNF, initialement identifiée pour son rôle dans le TCR-NER) a été observé après induction de dommages oxydatifs (tels que la 8-oxoG) (Menoni et al., 2012a). La protéine FACT (FAcilitates Chromatin Transcription), protéine qui possède une activité de chaperone et qui peut s'associer avec des remodeleurs de type SWI/SNF, est également recrutée après production de dommages oxydatifs par micro-irradiation laser et co-localise avec OGG1 (Charles Richard et al., 2016). Enfin il a été mis en évidence qu'OGG1 pourrait réguler l'état de méthylation de l'histone H4 via sa liaison avec la méthyltransférase PRMT5. En effet la diméthylation symétrique H4R3me2s est fortement diminuée dans des cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) *Ogg1*^{-/-} comparées aux cellules contrôles. De même, un siRNA contre OGG1 diminue la forme H4R3me2s tandis qu'une surexpression d'OGG1 l'augmente. Une interaction entre OGG1 et PRMT5 ainsi que l'histone H4 a été observée, l'interaction entre PRMT5 et H4 étant réduite dans les MEF *Ogg1*^{-/-} (Zhou et al., 2018). L'ensemble de ces études met en avant une coordination entre le remodelage de la chromatine et les différentes étapes du BER, même si les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore complètement caractérisés. Il reste également à comprendre comment le remodelage de la chromatine et le BER se

positionnent vis-à-vis de la transcription, particulièrement pour les lésions considérées comme non bloquantes telles que la 8-oxoG.

Le remodelage de la chromatine est indispensable à la réparation de l'ADN, mais également à une expression efficace des gènes. Les facteurs de transcription régulent l'expression des gènes en se liant à des séquences spécifiques de l'ADN qui seront détaillées dans le chapitre V. Bien que certaines séquences d'ADN soient accessibles car présentes sur la surface extérieure des nucléosomes, ou dans les courtes séquences reliant les nucléosomes, la plupart de l'information génétique reste néanmoins enfouie à l'intérieur du nucléosome. L'accès des facteurs de régulation à leurs sites spécifiques est facilitée par les complexes de remodelage de la chromatine, qui remanient la position des nucléosomes de façon à exposer aléatoirement chaque site d'ADN pendant une fraction de temps donnée (Felsenfeld and Groudine, 2003).

3. Organisation du noyau en domaines d'hétérochromatine et d'euchromatine

a. Notions d'hétérochromatine et d'euchromatine

Les travaux d'Emil Heitz furent les premiers à différencier par microscopie électronique dans un noyau en interphase deux types de chromatine distinctes par leur état de condensation : l'hétérochromatine, fortement contrastée au microscope et condensée, et l'euchromatine, faiblement contrastée et moins condensée (Figure III.4) (Heitz, 1928).

L'hétérochromatine est composée de deux types de chromatine. L'hétérochromatine constitutive, qui demeure condensée tout au long de la vie d'un organisme, et l'hétérochromatine facultative, qui peut s'assembler lorsqu'il est nécessaire de réprimer certains gènes. L'hétérochromatine constitutive est par exemple retrouvée autour des centromères ou sur les télomères. L'hétérochromatine facultative est régulée au cours du développement et la plupart du temps reste sous forme d'euchromatine. Un exemple typique d'hétérochromatine facultative est le chromosome X inactif présent chez les femelles mammifères, dont l'expression est réprimée à un stade précoce de l'embryogenèse (Craig, 2005).

L'hétérochromatine et l'euchromatine ne se distinguent pas uniquement d'un point de vue structural, mais se différencient également par leur fonction. Initialement, la fraction euchromatine était associée à la chromatine dite transcrite, avec une conformation « ouverte », facilement accessible à la machinerie transcriptionnelle. A l'inverse, l'hétérochromatine était corrélée à une chromatine plus dense, enrichie en régions inactives, considérée comme transcriptionnellement inerte. Cependant, au cours de ces dernières décennies ce paradigme a été largement remis en question, et il apparaît maintenant que l'hétérochromatine puisse être le siège de processus transcriptionnels. En effet, des études ont montré qu'il existait un lien entre la structure de la chromatine et la densité des gènes, et ce indépendamment du statut transcriptionnel des gènes. Les fibres de chromatine ouvertes sont corrélées à une densité plus élevée de gènes, mais pas nécessairement à un niveau élevé d'expression des gènes. A l'inverse,

les fibres de chromatine plus compactes possèdent une densité plus faible de gènes, mais qui peuvent être transcrits (Gilbert et al., 2004). La capacité des gènes à être actifs n'est donc pas nécessairement perdue lorsque la chromatine est compactée. De plus, les gènes inactifs proches de gènes actifs dans l'euchromatine peuvent aussi rester inactifs.

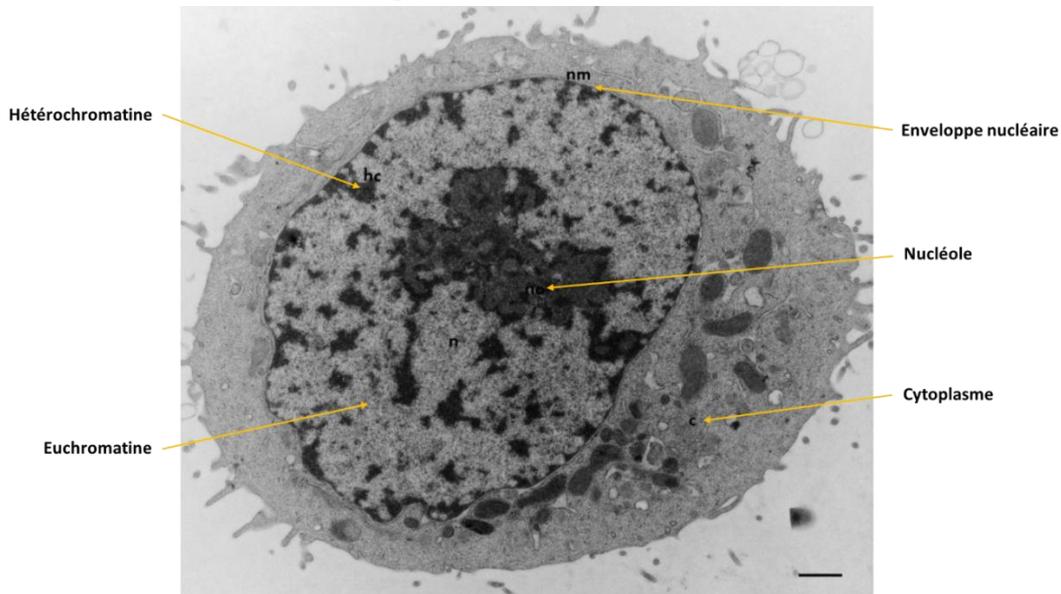


Figure III. 4 : Morphologie d'un noyau cellulaire de mammifère. Observation d'une cellule Hela en interphase par microscopie électronique. On peut distinguer le nucléole, l'hétérochromatine, condensée, et l'euchromatine, peu condensée. Le noyau est entouré d'une enveloppe nucléaire, qui le distingue du reste de la cellule, le cytoplasme (D'après Jackson, 1997).

Si la localisation des gènes n'est pas directement liée à leur état d'activation, quels facteurs peuvent influencer leur activité? La réponse à cette question est complexe et multifactorielle. Un facteur important est, comme vu précédemment, la MPT des histones. La chromatine active est en effet enrichie en histones acétylés (H3, H4, H2A) et en histone H3 di- ou tri-méthylé en lysine 4 (H3K4me). Par contraste, la chromatine inactive est caractérisée par une hypoacétylation et une triméthylation de l'histone H3 (H3K9me3) (Litt et al., 2001). La triméthylation en H3K9me3 sert d'ancrage à d'autres facteurs, tel que le facteur HP1, un composant de l'hétérochromatine condensée qui reconnaît spécifiquement la forme méthylée de H3 (Kalousi and Soutoglou, 2016). HP1 peut également interagir avec les enzymes méthyltransférases qui méthylent H3 (tel que SUV39H), formant une boucle de régulation positive qui va permettre à l'hétérochromatine de se propager sur de larges régions chromosomiques, jusqu'à ce qu'elle rencontre un élément de barrière (le fonctionnement des éléments de barrière sera détaillé dans le chapitre IV) (Lachner et al., 2001). Les exemples de MPT cités ne constituent bien évidemment pas une liste exhaustive, et de nombreuses autres MPT aident à réguler l'expression des gènes. Notamment, une hyperméthylation en H3K27 ou H4K20 est généralement associée à une répression des gènes (Craig, 2005)

b. Organisation chromatinienne de la réparation de l'ADN

Comme décrit dans les paragraphes précédents, les systèmes de réparation doivent avoir accès aux lésions enchevêtrées au sein de la chromatine. Sachant que l'hétérochromatine est définie comme une forme très condensée de la chromatine, les lésions qu'elle contient peuvent-elles être réparées ? Il a longtemps été pensé que cela n'était pas possible. Puis il a été proposé que l'hétérochromatine devait se décondenser pour permettre l'accès des protéines de réparation. Le senseur ATM joue un rôle central dans la réparation des CDB dans les régions d'hétérochromatine. Il phosphoryle la sérine 824 de KAP1, ce qui augmente la relaxation de la chromatine (Ziv et al., 2006; Goodarzi et al., 2008). Un autre modèle proposé, non nécessairement incompatible avec le précédent, est la relocalisation des cassures à la périphérie des domaines d'hétérochromatine suite à la phosphorylation de l'histone H2AX. Ce phénomène a été observé dans des cellules mammifères suite à l'application d'une micro-irradiation au niveau de chromocentres murins (équivalents à de l'hétérochromatine constitutive) (Jakob et al., 2011). Bien que l'ouverture de la chromatine ait également lieu pour la réparation des CDB générées dans l'euchromatine (Kruhlak et al., 2006), certaines études ont mis en évidence une condensation transitoire de la chromatine environnant une CDB. En effet l'induction de la forme méthylée H3K9me3 et le recrutement de la protéine HP1 seraient essentiels à l'activation des senseurs ATM et ATR (Burgess et al., 2014). Il est alors suggéré qu'une décompaction aurait d'abord lieu transitoirement juste après l'induction de la cassure, et que ce phénomène serait suivi d'une compaction qui permettrait de faciliter l'activation de la DDR.

Le statut chromatinien peut également influencer la réparation des dommages oxydatifs par le BER. Il a par exemple été montré que la protéine FEN-1, impliquée dans la voie longue du BER, n'est fortement recrutée que dans l'euchromatine (Lan et al., 2014). Ceci a également été montré pour l'ADN glycosylase OGG1, spécifiquement recrutée dans les domaines d'euchromatine suite à un stress oxydatif (Amouroux et al., 2010). Ces résultats indiquent une réparation des dommages oxydatifs dépendante du statut chromatinien, tout du moins pour certaines lésions.

II. Organisation du noyau en domaines sub-nucléaires

Une grande partie du volume nucléaire est occupée par le génome. Au sein du nucléoplasme, les chromosomes sont organisés en territoires, et cohabitent avec de nombreux autres corps nucléaires, qui participent activement aux fonctions nucléaires de la cellule, telles que la transcription ou la réparation. Les corps nucléaires (CN) sont des structures non entourées d'une membrane, sont localisés de façon propre dans le noyau, renferment des facteurs spécifiques et échangent leurs composants avec le nucléoplasme environnant de façon continue. Les CN apparaissent sous des formes très variées, allant de structures sphériques à des formes très irrégulières. L'organisation interne peut être très uniforme, ou, comme le nucléole, contenir plusieurs sous-compartiments. Leur formation est en général dynamique, notamment en réponse à des conditions de stress. Les CN sont nombreux dans le noyau, et les

mieux connus à ce jour sont le nucléole, les corps de Cajal, les corps PML, les speckles et les paraspeckles, ou encore les corps SAM68 et PcG (Figure III.5) (Nunes and Moretti, 2017). Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau III.I. Cependant il n'est pas exclu que le noyau contienne d'autres structures similaires, qui ne sont pas encore caractérisées comme des CN aujourd'hui.

Tableau III.1 : Caractéristiques des principaux corps nucléaires. La taille et la fonction est donnée pour chaque corps nucléaire (Adapté d'après Spector, 2001; Nunes and Moretti, 2017).

Corps Nucléaire	Taille (µm)	Fonction
Corps de Cajal	0.2 – 1	Biogenèse, maturation et recyclage des petits ARN
Clastosome	0.1 – 1.2	Contient des composants du protéasome et des protéines conjuguées à l'ubiquitine
Corps Gems	0.1 – 2	Epissage du pré-ARNm
Speckles	0.8 – 1.8	Stockage et recyclage des facteurs d'épissage
Paraspeckles	0.5	Régulation de l'ARNm
Nucléole	0.5 – 8	Biogenèse des ribosomes
Compartiment périnucléolaire	0.2 – 1	Régulation post-transcriptionnelle d'ARN transcrits par l'ARN Pol III
Corps PML	0.3 – 1	Régulation de la stabilité du génome, de la réparation de l'ADN, du contrôle de la transcription et de la défense antivirale

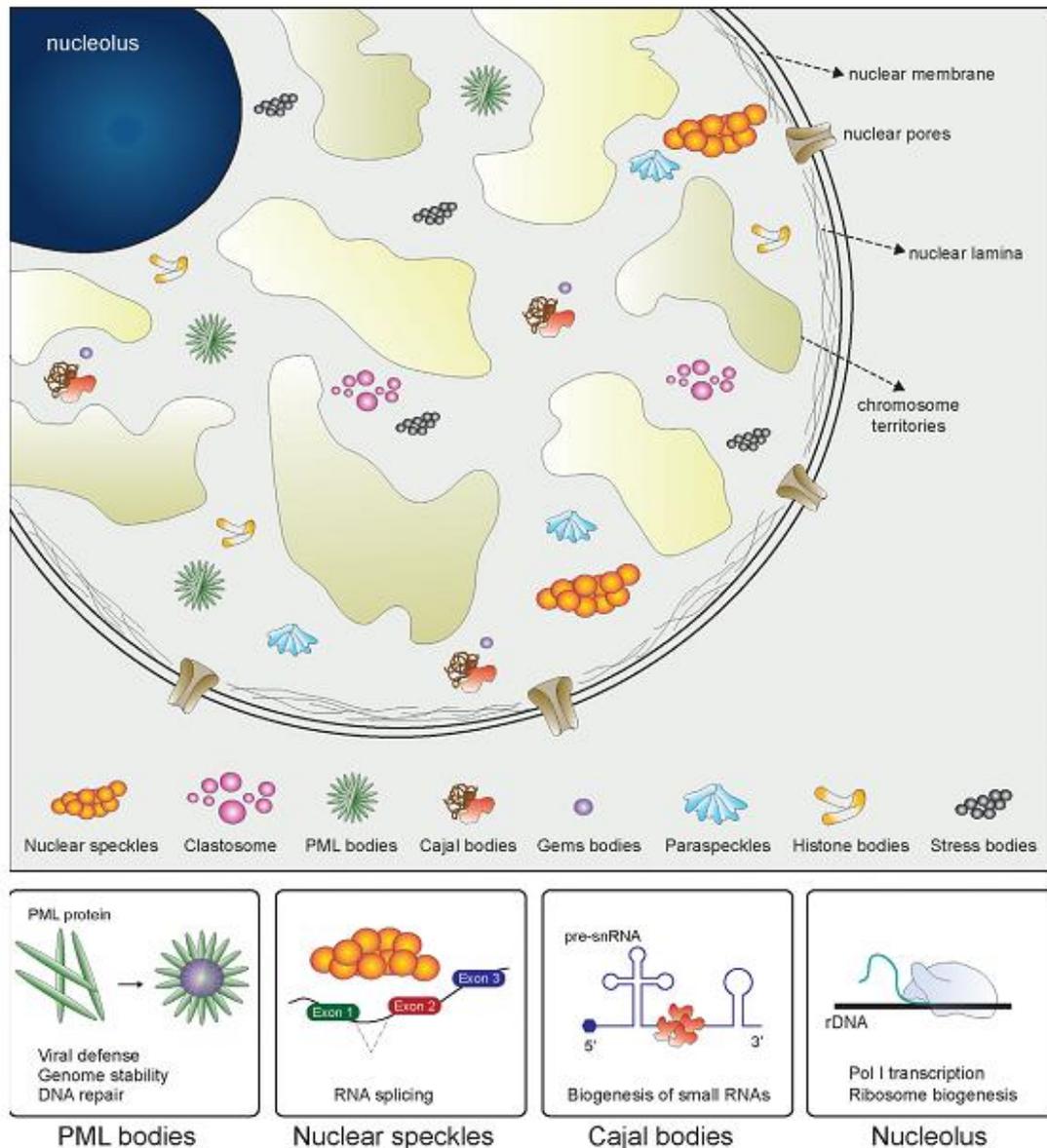


Figure III.5 : Représentation schématique des principaux domaines sub-nucléaires. Le noyau mammifère est organisé en territoires bien définis. Les chromosomes et les corps nucléaires interagissent continuellement pour assurer les fonctions essentielles du noyau cellulaire : transcription, traitement des ARNr ou encore réparation de l'ADN (D'après Nunes and Moretti, 2017).

1. Le nucléole

Les nucléoles sont probablement les CN les mieux décrits aujourd'hui. Ces CN sont le site de la synthèse et du traitement des ARNr, ainsi que de l'assemblage des sous-unités ribosomales. La transcription des gènes ARNr (ADNr) par la polymérase I permet de transcrire un pré-ARNr, qui est ensuite clivé pour générer les ARNr des ribosomes 5,8S, 18S et 28S. Chacun de ces ARNr est ensuite modifié et associé aux protéines ribosomales pour former les petites et grosses sous-unités ribosomales. Les ribosomes sont enfin exportés du noyau vers le cytoplasme pour participer à la traduction des ARNm (Lamond and Sleeman, 2003). Les noyaux des cellules des mammifères contiennent entre 1 et 5 nucléoles, chacun d'un diamètre

de 0,5-5 μm (Spector, 2001). Les ARNr composants le nucléole, connus sous le nom de NOR (Nucleolus Organizer Regions), sont codés par environ 400 gènes (dans une cellule diploïde normale) regroupés en répétitions en tandem (environ 300 répétitions), situés sur les bras courts des cinq chromosomes acrocentriques humains (Stults et al., 2008).

Le nucléole n'est pas délimité par une membrane, et se compose de 3 régions distinctes : les centres fibrillaires (CF), entourés par les composants fibrillaires denses (CFD) et les composants granulaires (CG). La transcription des ADNr par la polymérase I a lieu à l'interface des CF et CFD. Le traitement des pré-ARN et l'assemblage avec les protéines ribosomales est ensuite effectuée dans les CFD et les CG. Cette architecture est perdue si la transcription des ADNr est perturbée. Par exemple, l'inhibition de la Pol I par l'actinomycine D (un inhibiteur général de la transcription) entraîne un réarrangement des composants nucléolaires, ce qui mène à une désintégration complète du nucléole. L'altération de la morphologie des nucléoles affecte les principaux processus cellulaires, tels que la transcription, la réplication et la réparation (Németh and Grummt, 2018).

2. Les corps de Cajal

Les corps de Cajal sont des CN dont la fonction est liée aux nucléoles, mais qui ne contiennent ni ARNr ni ADNr. Un noyau peut contenir entre 1 et 10 corps de Cajal, chacun mesurant 0,2-1,0 μm (Spector, 2001). Les corps de Cajal accumulent des ARN non codants, tels que les snARN (small nuclear ARN) et les snoARN (small nucleolar ARN) du spliceosome, qui participent à la biogenèse des ARNr. Plusieurs études suggèrent que les corps de Cajal seraient impliqués dans le traitement des snARN et l'assemblage de snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) fonctionnelles (Staněk and Fox, 2017). Les snRNP sont des composants du spliceosome, le multi-complexe chargé de l'épissage des ARN pré-messagers. Ces snRNP sont composées des protéines U1, U2, U4/U6 et U5 (Dujardin et al., 2016). L'inhibition de la formation de di- ou tri-snRNP entraîne l'accumulation d'intermédiaires snRNP dans les corps de Cajal. De plus, l'inhibition des dernières étapes d'assemblage des snRNP déclenche la formation de corps de Cajal dans des cellules qui n'en avaient pas initialement, et ces corps de Cajal nouvellement formés accumulent des snRNP incomplètes (Novotný et al., 2015). Ces CN seraient donc des structures qui coordonnent, favorisent, et surveillent la biogenèse correcte des snRNP.

Les corps de Cajal accumulent aussi des centaines de snoARN. Par exemple les snoARN U3 et U8 transitent par les corps de Cajal avant de rejoindre le nucléole. Ceci indique que ces CN pourraient être impliqués dans la biogenèse des snoRNP. Cependant les étapes de la maturation qui pourraient avoir lieu dans les corps de Cajal ne sont toujours pas déterminées (Staněk and Fox, 2017).

3. Les corps PML

Les corps PML (ProMyelocytic Leukaemia) varient en taille (0,3-1,0 μm), et en nombre (10 à 30 structures) dans un noyau mammifère typique. Les corps PML sont aussi connus sous le nom de ND10 (Nuclear Domain 10, du fait de leur nombre autour de 10 par noyau), POD

(PML Oncogenic Domains), ou corps Kremer. Ils sont constitués des protéines PML, mais également d'autres protéines telles que Sp100, SUMO1, HAUSP, et CBP, qui sont localisées dans ces CN, mais qui diffusent aussi dans le reste du nucléoplasme (Spector, 2001). Les corps PML doivent leur nom à la découverte d'une protéine de fusion, résultant d'une translocation t(15;17) entre la protéine PML et le récepteur α de l'acide rétinoïque (RAR- α), anomalie présente dans plus de 98% des cas de leucémie promyélocytaire aigüe et entraînant une perturbation de ces CN. Les patients traités par acide rétinoïque ou par trioxyde d'arsenic entrent en rémission, et parallèlement les corps PML sont reformés (Spector, 2003).

Les corps PML concentrent des centaines de facteurs, impliqués dans une grande variété de processus cellulaires. Ils seraient impliqués dans la réparation de l'ADN, la sénescence, la réponse au stress, et la défense antivirale. Des études récentes ont confirmé leur rôle dans la réponse au stress, et ont montré que les corps PML sont fortement induits par un stress oxydatif. Des souris traitées par doxorubicine ou paraquat présentent un foie avec des corps PML plus larges, tandis que celles traitées par irradiation gamma ou acétaminophène présentent un foie avec un nombre plus élevé de corps PML (Sahin et al., 2014). Il a également été montré que les corps PML reconnaissent les protéines mal repliées, et les conjuguent avec des chaînes poly-SUMO2/3. RNF4 reconnaît et ubiquitine ces protéines mal repliées et conjuguées, menant à leur dégradation par le protéasome (Guo et al., 2014).

De nombreuses protéines impliquées dans la réparation des CDB sont localisées dans les corps PML, telles que les protéines senseurs ATM, ATR, BRCA1, Chk2, p53 ou le complexe MRN. Des protéines spécifiques de la RH sont également présentes, notamment RPA, RAD51 ou RAD52 (Dellaire and Bazett-Jones, 2004; Dellaire et al., 2006). La déplétion des corps PML entraîne une diminution significative du taux de RH dans les cellules humaines, sans affecter la réparation par la voie du NHEJ. De plus, cette déplétion n'affecte pas le recrutement des facteurs RPA et RAD51, suggérant un rôle spécifique des corps PML dans les dernières étapes de la RH (Yeung et al., 2012).

4. Les speckles et paraspeckles

Les speckles nucléaires sont des structures de forme irrégulière, distribuées de façon diffuse à travers le nucléoplasme, et occupant les espaces inter-chromatine. On dénombre 25 à 50 structures par noyau, chacune d'un diamètre de 0,8 à 1,8 μm . Ils sont composés de granules de 20 à 25 nm de diamètre, connectées par un réseau fibrilleux (Spector, 2001). On les connaît aussi sous le nom de « SC35-domains », ou « interchromatin granule clusters » (IGC). Ces CN servent de réservoirs aux facteurs d'épissage, et sont donc enrichis en snRNP (comme les corps de Cajal), et en facteurs d'épissage non-snRNP. Les speckles sont souvent localisés près des gènes activement transcrits, mais ne sont pas des sites directs d'épissage. Lorsque la transcription est inhibée, ce qui bloque également l'épissage, toutes les snRNP ainsi que tous les facteurs d'épissage s'accumulent dans des speckles qui s'élargissent (Misteli, 2000). Cependant, les speckles contiennent aussi des espèces d'ARN polyadénylés, et on ne sait toujours pas si ces ARN sont des composants réels des speckles ou des ARNm destinés à être exportés vers le cytoplasme (Lamond and Sleeman, 2003). Les protéines au sein des speckles sont dynamiques et sont fréquemment recrutées vers les sites de transcription dans le noyau.

Ces structures se désassemblent lorsque la cellule entre en mitose, et se reforment dans les cellules filles. Les composants des speckles sont constamment en mouvement d'un speckle à un autre, et d'un speckle à un site de transcription (Misteli et al., 1997; Gorski et al., 2006). Un rôle de ces CN dans la réponse au stress oxydatif a également été montré. Après irradiation par UVA, la protéine OGG1 forme des foci qui co-localisent avec les speckles. Cette relocalisation d'OGG1 n'est pas dépendante de sa capacité à reconnaître la 8-oxoG, mais n'est pas observée en présence d'anti-oxydants, ce qui suggère que les ERO serviraient de signal pour cette relocalisation (Campalans et al., 2007).

Les paraspeckles doivent leur nom à une localisation similaire aux speckles, c'est-à-dire dans l'espace inter-chromatine, même si ces deux types de structures sont présents dans des régions bien distinctes. Les paraspeckles ne contiennent ni snRNP, ni facteurs d'épissage. Ses composants sont majoritairement formés par un groupe d'environ 40 protéines pouvant lier l'ARN. Ces protéines circulent en continu entre le nucléole et les paraspeckles. En absence de transcription par l'ARN polymérase II, les composants des paraspeckles (tels que p54/NRB, PSP1 ou PSP2) s'accumulent dans une structure distincte à la périphérie du nucléole (Lamond and Sleeman, 2003).

5. Autres corps nucléaires

D'autres structures occupent également le nucléoplasme, et interagissent avec le reste des domaines sub-nucléaires. Par exemple, les corps PcG contiennent les protéines du groupe polycomb et sont associées avec l'hétérochromatine péri-centromérique. Ces domaines varient en nombre, en taille, et en composition. Ces structures serviraient de stockage et seraient impliquées dans la répression de certains gènes chez la drosophile (Spector, 2001). Le compartiment périnucléolaire (CPN) et le corps nucléaire SAM68 sont deux autres structures uniques, associées avec la surface du nucléole, et auraient un rôle dans le métabolisme des ARN (Huang, 2000). Leur taille varie de 0,25 à 1,0 μm et on observe entre 1 et 10 structures par noyau. Les CPN participent à la régulation post-transcriptionnelle d'ARNs transcrits par l'ARN polymérase III (Nunes and Moretti, 2017). Les corps Gems sont des structures dont la fonction est encore mal comprise aujourd'hui. Le principal composant de ces CN sont les membres du complexe SMN. Dans le cytoplasme, le complexe SMN est essentiel à la biogenèse des snRNP, mais son rôle dans le noyau est toujours inconnu. La perte des protéines SMN entraîne une dégénérescence des neurones moteurs et une atrophie musculaire spinale (AMS) (Staněk and Fox, 2017). Enfin, une autre sous-catégorie de CN a été décrite en 2002, nommée le clastosome. Cette structure est enrichie en composants du protéasome 26S (le cœur actif 20S et les complexes régulateurs 19S), en ubiquitine, et en substrats du protéasome. Les clastosomes apparaissent spécifiquement lorsqu'une forte activité du protéasome est nécessaire, et disparaissent lorsque les cellules sont exposées à des inhibiteurs du protéasome (Lafarga et al., 2002).

III. Conclusion générale du chapitre III

Ces dernières décennies ont fourni de nombreuses preuves d'une organisation spatiale et fonctionnelle du noyau. On sait maintenant que chaque CN possède des rôles clairs et distincts, et qu'il existe une communication incessante entre les domaines sub-nucléaires, ainsi qu'entre ces domaines et la chromatine, elle-même organisée en territoires chromosomiques. L'ADN contenu dans le noyau de la cellule, chargé de nombreuses protéines pour former la chromatine, est en outre continuellement exposé à des attaques endogènes et exogènes. Comme vu dans ce chapitre, les protéines de réparation opèrent dans un environnement où la chromatine est plus ou moins compacte. Les systèmes de remodelage de la chromatine sont alors indispensables pour permettre à ces systèmes de réparation d'avoir accès aux lésions produites dans la molécule d'ADN. Mais le modelage des chromosomes fait également intervenir d'autres types de protéines. Parmi ces protéines, le chapitre suivant a pour but de décrire le complexe des cohésines, protéines maintenant connues pour de multiples rôles, dont leur contribution à la réparation de l'ADN.

Chapitre IV – Le complexe des cohésines

Lors de la division cellulaire, l'ADN est soumis à une étape de forte compaction dans le noyau afin de générer les chromosomes mitotiques. Comprendre comment l'ADN est compacté a été l'objet d'une intense recherche ces dernières décennies. Comme présenté dans le chapitre précédent, les chromosomes ne sont pas uniquement constitués d'ADN, mais également de multiples protéines qui aident à leur mise en forme, à la régulation des gènes et à la maintenance du génome. Les principaux composants impliqués dans le modelage des chromosomes sont les complexes SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) (Uhlmann, 2016).

I. Les complexes SMC

1. Historique de la découverte des complexes SMC

Les protéines SMC et leurs partenaires kléïnes ont été découverts il y a presque 30 ans, grâce à des études génétiques et biochimiques chez des procaryotes (*Escherichia coli*) et chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Des analogues ont ensuite été identifiés chez les organismes eucaryotes plus complexes invertébrés (*Caenorhabditis elegans*) et vertébrés (Nasmyth and Haering, 2005). La première protéine de type SMC a été identifiée à partir d'un crible génétique chez *E. coli* (Niki et al., 1991). Afin d'identifier les protéines impliquées dans la partition des 2 nucléoïdes lors de la division bactérienne, Niki/Hiraga et collègues ont isolé des souches mutantes dans lesquelles une grande proportion de cellules filles étaient dépourvues de nucléoïde. Le gène identifié responsable du défaut de partition du nucléoïde est *mukB* (Niki et al., 1992, 1991). La protéine MukB, de 177 kDa, contient une longue région centrale composée principalement d'hélices α et des domaines globulaires aux extrémités N- et C-terminales. Les domaines N- et C-terminaux contiennent un site de liaison à l'ATP, et la protéine peut se dimériser à partir de sa région centrale (Niki et al., 1992, 1991).

La mise en évidence de protéines homologues à MukB, chez les eucaryotes, provient de l'identification d'une souche mutante de *S. cerevisiae* dont la capacité à maintenir un minichromosome centromérique artificiel était altérée. Le gène identifié responsable de ce phénotype fut nommé *SMC1* d'après son rôle dans la Stabilité des MiniChromosomes. Le gène *SMC1* code pour une protéine essentielle de 141 kDa, présentant une structure primaire similaire à MukB, mais une faible identité de séquence (de seulement 17.5%) avec ce dernier (Strunnikov et al., 1993). La caractérisation de protéines de type MukB et SMC1 a permis de prédire l'existence d'une famille de protéines impliquées dans la partition des chromosomes. L'analyse des séquences d'ADN contenues dans les bases de données de l'époque a révélé l'existence de protéines homologues chez les mammifères et chez des bactéries autres qu'*E. Coli* (Notarnicola et al., 1991). Ces données ont en effet permis d'identifier une superfamille de protéines, les protéines SMC, conservées chez les procaryotes et chez les eucaryotes.

2. Architecture des complexes SMC

Les complexes SMC sont composés d'un hétérodimère de protéines SMC et d'une kléistine. Chaque protéine SMC est composée d'une longue région flexible, et de domaines N- et C-terminaux, contenant respectivement les motifs Walker A et B (Figure IV.1A). L'association des domaines N- et C-terminaux permet de reconstituer un domaine NBD (Nucleotidic Binding Domain). Le motif Walker A est essentiel à la liaison de l'ATP, tandis que le motif Walker B est nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP. L'hétérodimérisation des protéines SMC est permise par la flexibilité de leurs régions charnières. De ce fait les domaines NBD de chacune des protéines SMC s'associent générant ainsi un domaine structurellement actif pour lier l'ATP. Cette conformation permet à la fois de fermer l'anneau du complexe SMC, et de potentiellement catalyser l'hydrolyse de l'ATP (Figure IV.1B). Il existe trois types de complexes SMC : les cohésines (Figure IV.1C-a), les condensines (Figure IV.1C-b et c) et le complexe SMC5-SMC6 (Figure IV.1C-d) (Losada and Hirano, 2005).

a. Le complexe des cohésines

Le complexe dit des cohésines, et en particulier les deux sous-unités SMC, est fortement conservé chez les organismes eucaryotes. Le complexe est composé des sous-unités SMC1 et SMC3 et d'une protéine SCC1 (ou RAD21) (Gruber et al., 2003). La sous-unité RAD21 du complexe établit des contacts avec les sous-unités SMC. L'extrémité C-terminale de RAD21 lie le domaine ATPase de SMC1, tandis que l'extrémité N-terminale lie la région enroulée en spirale juste adjacente au domaine ATPase de SMC3 (Figure IV.1C) (Haering et al., 2004; Gligoris et al., 2014). Les trois protéines forment alors une structure typique en forme d'anneau. D'autres sous-unités viennent s'ajouter au cœur du complexe : la protéine SCC3, possédant deux homologues présents chez les vertébrés : SA1 ou SA2 (Losada et al., 2000; Nasmyth and Haering, 2005). Deux types de complexes existent chez les cellules somatiques de vertébrés : chacun possède les sous-unités SMC1, SMC3 et RAD21, et soit SA1 ou SA2 (Losada et al., 2000). L'abondance relative des deux complexes varie en fonction du type cellulaire et/ou du stade de développement. Chez l'homme, la forme SA2 est beaucoup plus abondante que la forme SA1, tandis que la forme SA1 prédomine chez *Xenopus* par exemple (Losada et al., 2000). Chez l'homme, les complexes cohésines qui maintiennent les chromatides sœurs aux télomères et aux centromères contiennent de façon majoritaire, respectivement SA1 et SA2 (Canudas and Smith, 2009).

Il a été mis en évidence que les cohésines peuvent relier des molécules d'ADN (Haering et al., 2008). L'intégrité de la structure en anneau des cohésines est fondamentale pour son association avec la chromatine. Les différents modèles proposés décrivant comment les cohésines encerclent les molécules d'ADN sont détaillés dans la suite de ce chapitre.

b. Les complexes des condensines

Les condensines contiennent trois sous-unités non-SMC en plus du dimère SMC2-SMC4. Les vertébrés possèdent deux types distincts de complexes, les condensines I et les condensines II, qui diffèrent par leurs sous-unités non-SMC. Les condensines I contiennent CAP-D2, CAP-H et CAP-G, tandis que les condensines II contiennent CAP-D3, CAP-H2 et CAP-G2 (Figure IV.1C-b et c). Les condensines sont connues pour réguler la forme des chromosomes et leur condensation durant la mitose (Aragon et al., 2013; Losada and Hirano, 2005).

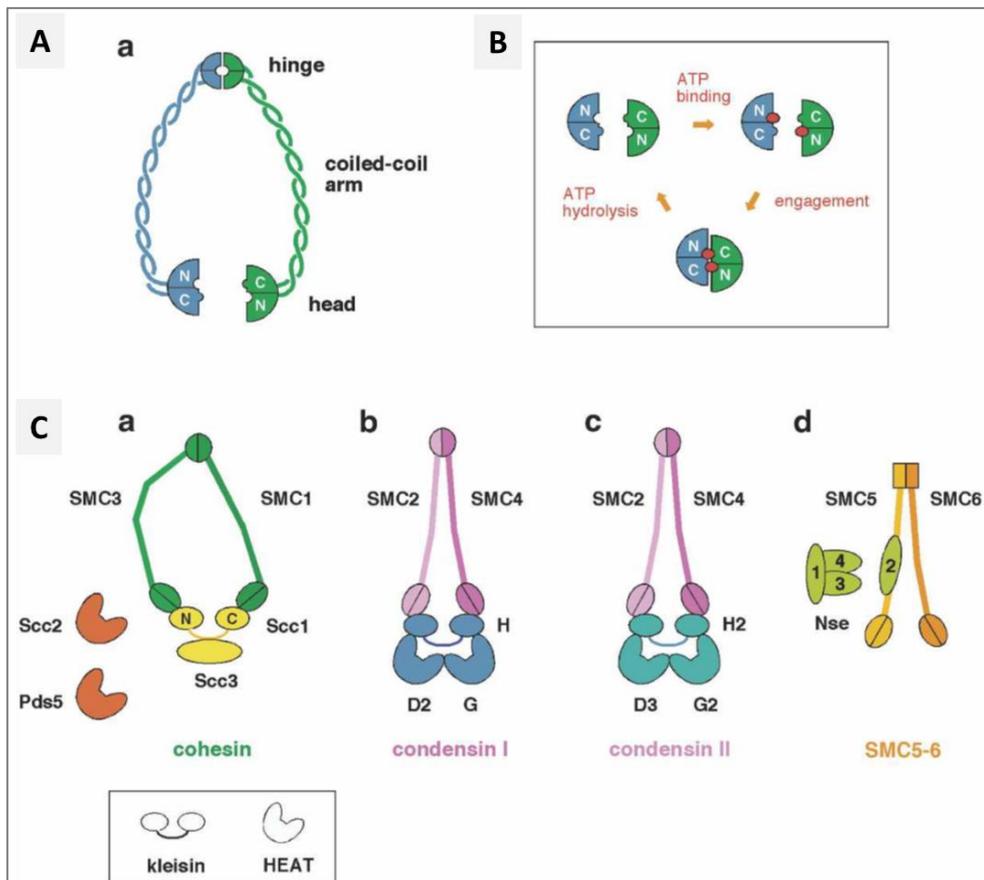


Figure IV.1 : Architecture des complexes SMC. **A.** Chaque protéine SMC est composée d'hélices α , d'une région charnière qui permet le repliement de la protéine, et de domaines N- et C-terminaux. **B.** Les domaines N- et C-terminaux contiennent des domaines de liaison à l'ATP. Tous les complexes SMC contiennent deux protéines SMC et une protéine kléisine qui les relie. **C.** A cet anneau qui a une forme de triangle s'ajoute plusieurs protéines, spécifiques du type de complexe, qui interviennent dans la régulation du complexe (Adapté d'après Losada and Hirano, 2005).

c. Le complexe SMC5-6

Un troisième complexe SMC, présent chez tous les vertébrés, est composé d'un hétérodimère SMC5-SMC6, et de quatre sous-unités non-SMC, Nse1 à Nse4. La fonction

cellulaire de ce complexe n'est pas encore complètement comprise, mais serait liée à la réparation des dommages à l'ADN (Uhlmann, 2016; Losada and Hirano, 2005). Le gène codant pour SMC6/Rad18 a été identifié par un crible génétique de mutants radiosensibles chez *S. pombe* (Lehmann et al., 1995). Des études génétiques ont montré par la suite que des mutations dans d'autres sous-unités du complexe peuvent aussi causer une hypersensibilité aux dommages de l'ADN, et ont suggéré un rôle du complexe dans la réparation des dommages par RH, ainsi que dans la méiose (Losada and Hirano, 2005).

3. Distinction entre cohésines et condensines

Depuis ces vingt dernières années, il est clairement établi que l'action concertée des cohésines et des condensines contribue à une ségrégation efficace des chromosomes durant le cycle cellulaire mitotique, et que les deux types de complexes interviennent dans l'organisation structurale des chromosomes en interphase. Cependant, en dépit de leur structure similaire, cohésines et condensines agissent de façon différente sur l'architecture des molécules d'ADN.

Les cohésines et les condensines interviennent lors d'étapes distinctes de la mitose. Les cohésines sont chargées sur l'ADN en phase G1 du cycle cellulaire, et établissent la cohésion entre les chromatides sœurs pendant la phase S. Une importante réorganisation des chromosomes commence en prophase, qui s'accompagne d'une première libération de cohésines et un chargement progressif des condensines. Ces deux actions concomitantes mènent à la formation de chromosomes en métaphase avec deux chromatides sœurs bien définies (Figure IV.2). Ce processus est un prérequis indispensable à la séparation finale des chromatides sœurs, déclenchée par le clivage protéolytique des cohésines au début de l'anaphase (Losada and Hirano, 2005). On note ici que le chargement des condensines se fait en deux temps, avec une distribution spatiale et temporelle distincte. Les condensines II sont chargées en premier durant la prophase, et créent des liens qui raccourcissent l'axe des chromosomes (compression axiale). Quant aux condensines I, elles sont chargées en prométaphase, et établissent des connections qui diminuent le diamètre des chromatides (compression latérale) (Kschonsak and Haering, 2015). Les condensines I et II restent associées aux chromatides pendant l'anaphase afin de maintenir un niveau suffisant de compaction des chromatides sœurs pendant leur migration aux pôles opposés du noyau (Figure IV.2).

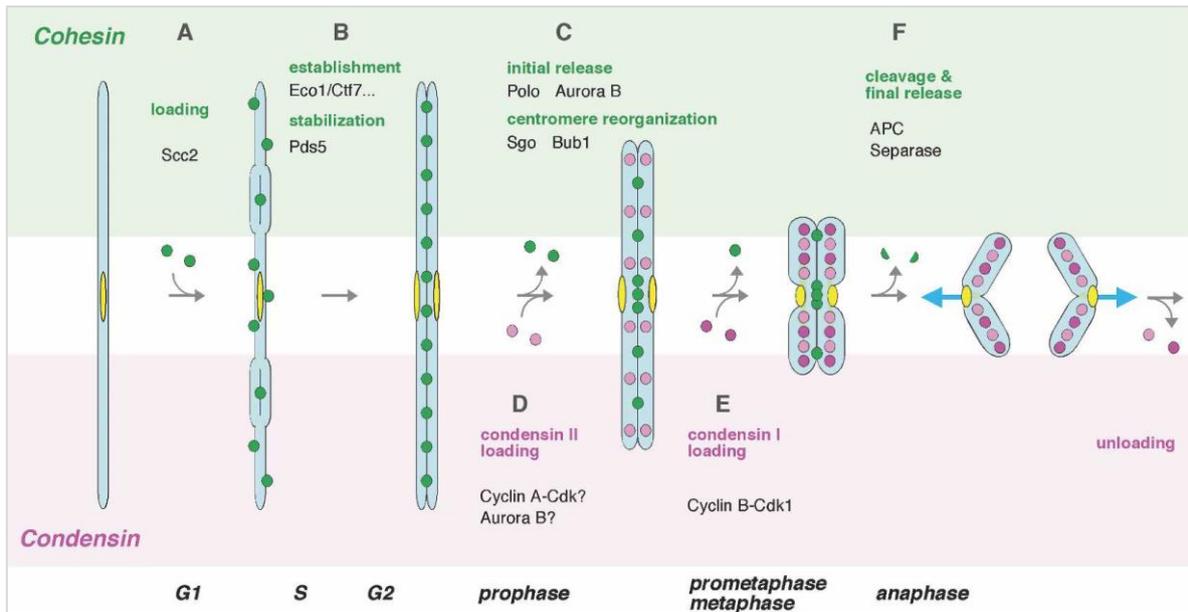


Figure IV.2 : Rôles des cohésines et des condensines dans la formation des chromosomes mitotiques. Les parties du haut et du bas du schéma représentent les évènements majeurs régulant respectivement la dynamique des cohésines et des condensines pendant le cycle cellulaire. Les cohésines sont chargées dès la phase G1 et peuvent être dissociées à différents moments du cycle. Les condensines I et II sont respectivement chargées en prometaphase et en prophase, et demeurent associées aux chromosomes jusqu'à la fin de la mitose (D'après Losada and Hirano, 2005).

La dynamique des deux types de complexes devant être finement contrôlée, de nombreux facteurs régulateurs et spécifiques de chaque complexe participent à la mitose. Les facteurs spécifiques de la régulation des condensines ne seront pas détaillés ici, mais ceux participant au chargement, au déplacement, et au clivage des cohésines seront décrits dans les paragraphes suivants.

II. Régulation des cohésines

1. Capture de l'ADN et dissociation des cohésines

Le complexe des cohésines est en dynamique constante avec les chromosomes, et subit de nombreux cycles d'association/dissociation, notamment lors des étapes antérieures à la réplication de l'ADN. En revanche, lors des étapes suivantes et jusqu'à la fin de la mitose, les cohésines restent associées pour maintenir fermement les chromatides sœurs reliées entre elles (Figure IV.3). Le cycle de chargement et de libération des cohésines le long des molécules d'ADN est gouverné par deux groupes de protéines : les protéines NIPBL et MAU2, chargées du chargement des cohésines, et les protéines PDS5 et WAPL, ou la séparase, impliquées dans la dissociation des cohésines. Les mécanismes de clivage ou de libération des cohésines sont différents en fonction de la phase du cycle dans lequel elles sont engagées (Figure IV.3). La

quantité de cohésines présentes sur la chromatine à chaque instant résulte donc des actions antagonistes de ces deux types de protéines (Losada, 2014; Gruber, 2017).

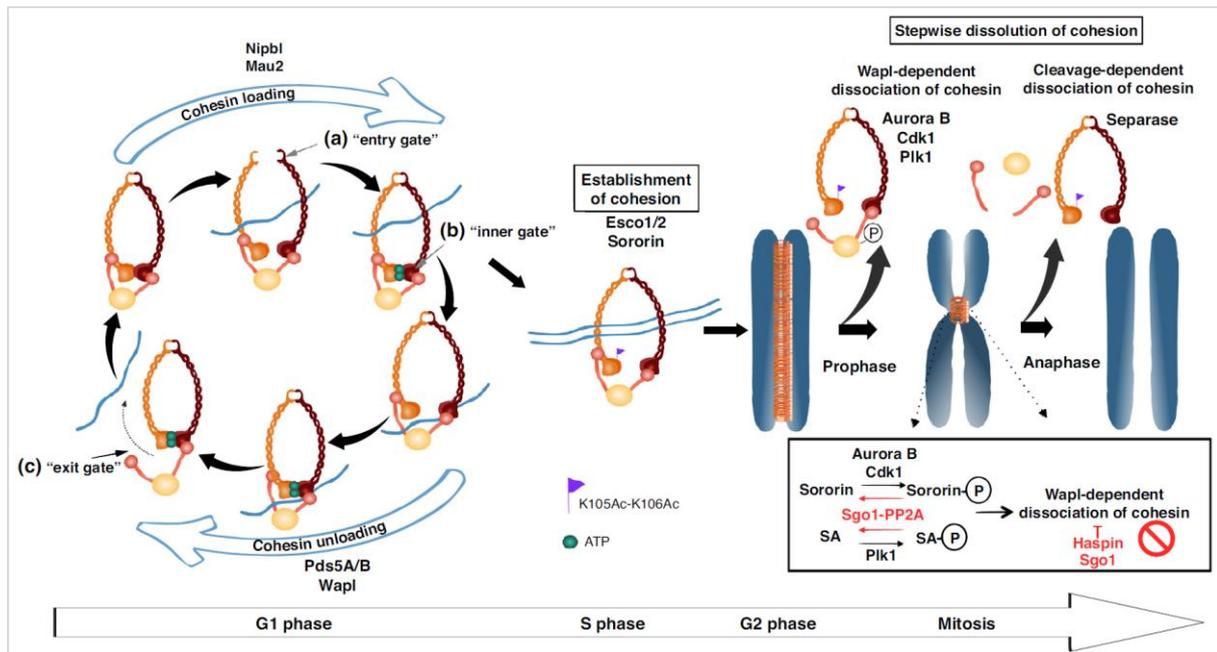


Figure IV.3 : Dynamique des cohésines à travers le cycle cellulaire chez les vertébrés. Schéma de gauche : En phase G1 le chargement des cohésines est facilité par le couple NIPBL-MAU2 et nécessite l'hydrolyse de l'ATP. Ce chargement s'effectue via une « porte d'entrée » (entry gate) située entre les régions charnières de SMC1 et SMC3. Le complexe est dissocié par l'action du couple PDS5-WAPL. L'ADN est alors libéré en passant d'abord dans une poche située entre SMC1-SMC3 et RAD21 (inner gate), puis via la "porte de sortie" (exit gate) située entre le domaine N-terminal de RAD21 et la région ATPase de SMC3. Schéma du milieu : L'établissement de la cohésion en phase S est coordonné avec la réplication et nécessite l'acétylation de deux résidus lysine de la sous-unité SMC3 par ESCO1/2, ainsi que la liaison de la sororine avec PDS5. Schéma de droite : La dissociation du complexe des cohésines en mitose est réalisée en deux étapes. La première se situe le long des bras chromosomiques en prophase et nécessite les kinases Aurora B, CDK1 et PLK1. La cohésion est maintenue sur les centromères grâce au couple Sgo1-PP2A jusqu'en anaphase. La séparation finale du complexe au début de l'anaphase implique le clivage protéolytique de RAD21 par la séparase (D'après Morales and Losada, 2018).

a. Cycle de chargement et de dissociation des cohésines en phase G1

Lorsqu'elles sont chargées sur l'ADN en phase G1, les cohésines interagissent avec une seule chromatide (Figure IV.3). Cette étape nécessite la présence de l'hétérodimère NIPBL-MAU2 (Scc2-Scc4 chez la levure) et l'hydrolyse de l'ATP par leur domaine ATPase (Barrington et al., 2017; Losada, 2014). Il a été montré chez la levure que Scc2 seul catalyse le chargement des cohésines *in vitro* (Murayama and Uhlmann, 2014). Dans cette étude, les auteurs ont en effet observé la même efficacité de chargement des cohésines lorsque l'ADN est incubé avec Scc2 seul, ou avec le couple Scc2-Scc4. Cependant, ils n'excluent pas la possibilité que le rôle de Scc4 ne soit pas détecté dans un système *in vitro*. En effet, la structure cristallographique de ces deux protéines a révélé la formation d'un complexe où les deux sous-unités sont physiquement et intimement liées, l'extrémité N-terminale de Scc2 étant en

interaction avec la région centrale de Scc4 (Chao et al., 2015). Ces données structurales ont été validées *in vivo* car l'absence de la protéine Scc4 empêche le recrutement de la sous-unité Scc2 (Murayama and Uhlmann, 2014). Il est donc proposé que Scc4 servirait d'adaptateur au chargement de Scc2 sur la chromatine et que Scc2 serait la sous-unité qui, en interagissant avec les cohésines, permettrait leur chargement sur l'ADN (Chao et al., 2015).

Deux modèles ont été proposés pour expliquer comment les cohésines peuvent capturer une molécule d'ADN. Le premier prédit des portes d'entrée et de sortie similaires, tandis que le deuxième propose deux voies différentes pour l'entrée et la sortie (Figure IV.4) (Barrington et al., 2017; Gruber, 2017). Dans le premier modèle, il est proposé que l'entrée et la sortie de l'ADN ait lieu de façon séquentielle : i) à l'interface des domaines NBD des sous-unités SMC1 et SMC3, ii) entre l'extrémité N-terminale de RAD21 et le domaine NBD de SMC3 (Murayama and Uhlmann, 2014). Le deuxième modèle propose deux voies bien distinctes d'entrée et de sortie de l'ADN (Nasmyth, 2011), où l'interface entre les régions charnières de SMC1 et SMC3 représente la porte d'entrée, et l'interface entre SMC3 et RAD21 la porte de sortie. Dans les deux modèles l'engagement ou le désengagement de la tête ATPase est donc essentiel dans la régulation du cycle, qu'elle intervienne à la fois dans l'ouverture et la fermeture de l'anneau, ou uniquement au moment de la libération des cohésines.

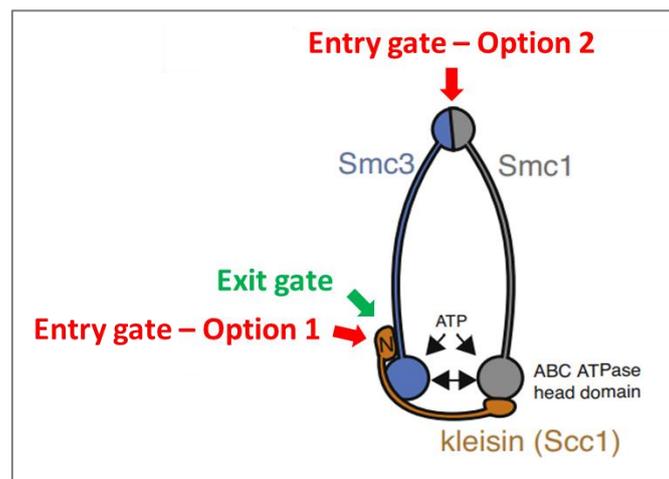


Figure IV.4 : Modèles d'entrée et de sortie de l'ADN du complexe cohésines. Un premier modèle propose une unique porte d'entrée et de sortie de l'ADN située entre la sous-unité SMC3 et la kléisine RAD21 (option 1). Un second modèle défend l'existence de deux portes distinctes : la porte d'entrée se trouverait à l'interface des régions charnières de SMC1 et SMC3 (option 2) et la porte de sortie serait située entre la sous-unité SMC3 et la kléisine RAD21 (D'après Gruber, 2017).

Tous les complexes SMC, dont les cohésines, sont concentrés autour des centromères, ainsi que le long des bras chromosomiques. L'enrichissement centromérique est un outil indispensable dans l'orientation des chromatides sœurs, et leur sert à contrebalancer la force appliquée par le fuseau mitotique (Tanaka et al., 2000). Le long des chromosomes, les cohésines sont chargées au niveau des promoteurs des gènes souvent hautement exprimés, dont les protéines ribosomales et les gènes codant les ARNt (Uhlmann, 2016). Nous verrons par la suite que cette liaison près des sites promoteurs a un impact sur la régulation d'expression des gènes.

b. Etablissement de la cohésion

L'établissement de la cohésion a lieu pendant la phase S de réplication de l'ADN. Ce processus fait intervenir l'acétylation des deux résidus lysine localisés dans le domaine NBD de la sous-unité SMC3 (K106 et K105, Figure IV.3), les mêmes résidus impliqués dans l'activité ATPase (Uhlmann, 2016). L'acétylation des résidus lysine est réalisée par deux acétyltransférases (ESCO1 et ESCO2 chez l'homme, Eco1 chez la levure), ce qui conduit à l'inhibition de l'activité ATPase et donc au verrouillage de l'anneau (Uhlmann, 2016). Ceci explique en partie comment la liaison des cohésines à l'ADN est stabilisée pendant la réplication, et cette capacité unique des cohésines d'établir durablement la liaison entre les chromatides sœurs (Uhlmann, 2016). Les résidus lysine K106 et K105 de SMC3 jouent donc un rôle important dans la dynamique de formation du complexe cohésines/ADN. En effet, leur implication dans l'activité ATPase de SMC3 favorise le cycle association/dissociation des cohésines en phase G1, alors que leur modification par acétylation, et donc l'inhibition de l'activité ATPase, permet de maintenir fermement les cohésines sur les chromatides. La réaction d'acétylation doit donc être finement régulée dans le temps ; elle doit intervenir après que toutes les réactions permettant l'entrée de l'ADN dans les cohésines soient complétées (réactions nécessitant l'hydrolyse de l'ATP), mais doit être effectuée dès que possible pendant la phase S. Si cet enchaînement n'est pas parfaitement respecté, une des chromatides sœurs pourrait s'échapper de l'anneau avant l'anaphase, et entraîner un défaut de séparation des chromatides.

Chez les vertébrés, l'acétylation de SMC3 entraîne le recrutement d'un autre composant essentiel, la sororine, qui entre en compétition avec WAPL pour la liaison à PDS5. Ces deux événements sont couplés et doivent avoir lieu pendant la phase S (Uhlmann and Nasmyth, 1998; Ladurner et al., 2016). La sororine se lie à PDS5 et neutralise l'activité de dissociation des cohésines assurée par le couple PDS5-WAPL (détaillé dans le paragraphe suivant) (Nishiyama et al., 2010). La liaison de la sororine est dynamique, et sa capacité à étreindre deux segments d'ADN au lieu d'un seul dépendrait d'un changement de conformation des cohésines acquis pendant cette phase d'établissement (Ladurner et al., 2016). La sororine interagit avec les cohésines liées à l'ADN pour assurer leur établissement et leur maintien en phases S et G2 respectivement (Schmitz et al., 2007). Elle devra donc rester liée au complexe jusqu'à la prophase.

Deux modèles mutuellement non-exclusifs sont proposés pour expliquer comment un anneau de cohésines peut enserrer deux brins d'ADN sœurs. Une première possibilité serait que la fourche de réplication passe au travers des anneaux de cohésines, qui capturent donc efficacement les deux brins d'ADN en même temps (modèle évoqué ci-dessus). Dans ce cas, une acétylation à n'importe quel moment avant ou pendant le passage de la fourche devrait entraîner l'établissement des cohésines sur l'ADN (Uhlmann, 2016).

La deuxième possibilité est proposée par un nouveau modèle « d'extrusion de boucle », établi à l'origine par des simulations *in silico*. Ce modèle vise à expliquer la formation de domaines chromosomiques au sein du noyau (Goloborodko et al., 2016). D'après ce modèle, les domaines chromosomiques sont formés quand des facteurs d'extrusion de boucle (FEB) se déplacent le long de l'ADN jusqu'à ce qu'ils rencontrent des éléments de barrière, inhibant leur déplacement. Les cohésines feraient partie de ces FEB, et agiraient de concert avec CTCF

(CCCTC-binding factor), lui-même identifié comme un élément de barrière. Le rôle respectif des cohésines et de CTCF dans l'organisation du génome, notamment la formation de boucles, sera détaillée plus amplement dans la suite de ce chapitre.

c. Mécanismes de dissolution de la cohésion

La dissolution du complexe cohésines peut avoir lieu à différents moments du cycle. La première possibilité est pendant la phase G1, où les cohésines subissent en continu des cycles de chargement et de dissociation. Dès que les cellules subissent une phase de réplication, et sont entrées en mitose, la séparation ne peut avoir lieu qu'à deux moments : pendant la prophase ou au début de l'anaphase (Nasmyth and Haering, 2009) (Figure IV.3). La régulation de la dissociation des cohésines pendant la mitose procède de façon différente chez la levure et les vertébrés. Chez ces derniers, la plupart des cohésines sont relâchées quand les cellules entrent en prophase. La fraction de cohésines restant associée aux chromosomes condensés est enrichie autour des centromères, et ne sera clivée qu'au début de l'anaphase. Chez la levure, toutes les cohésines sont dissociées lors du passage entre la prométaphase et l'anaphase (Morales and Losada, 2018).

La première dissociation qui a lieu au cours de la mitose est appelée la « voie de prophase », voie qui est régulée par plusieurs kinases spécifiques de la mitose (Figure IV.5). Un premier évènement est la phosphorylation de la sous-unité SA par la kinase Plk1 (Hauf et al., 2005). Cette phosphorylation est indispensable mais non suffisante à la dissociation, qui requiert également l'action de WAPL. Comme évoqué précédemment, la sororine se lie à PDS5 pendant la phase de cohésion, ce qui déplace WAPL et empêche l'ouverture de l'anneau pendant la phase S (Nishiyama et al., 2010). Pour restaurer la fonction de WAPL, la sororine doit être éliminée du complexe cohésines en prophase. Ceci nécessite la phosphorylation de la sororine par les kinases Cdk1 et Aurora B (Nishiyama et al., 2013). Même si la majorité des cohésines est dissociée pendant la prophase, les complexes associés aux centromères doivent cependant demeurer intacts jusqu'à l'anaphase. Afin de protéger la petite fraction de cohésines présentes aux centromères, la protéine Sgo1 (Shugosin 1) et son partenaire PP2A (Protein Phosphatase 2) antagonisent la phosphorylation de la sororine, spécifiquement au niveau des centromères (Liu et al., 2013). L'interaction entre Sgo1 et les cohésines est favorisée par la phosphorylation de Sgo1 par Cdk1, et rivalise avec la liaison de WAPL. Une quatrième kinase, nommée Haspin, rivalise aussi avec la liaison de WAPL à PDS5 en se liant à ce dernier, contribuant ainsi à maintenir les cohésines aux centromères pendant la prophase (Morales and Losada, 2018).

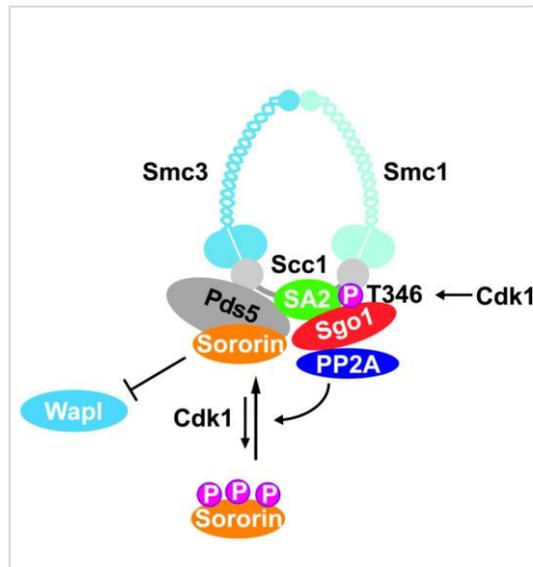


Figure IV.5 : Régulation de la présence des cohésines aux centromères pendant la prophase. La dissociation des cohésines pendant la prophase nécessite l'intervention de plusieurs kinases. Cdk1 phosphoryle la sororine, permettant sa dissociation du complexe et la liaison de WAPL, qui maintient spécifiquement le complexe cohésines au niveau des centromères. PPA2, le partenaire de Sgo1, aide également à maintenir le complexe aux centromères jusqu'à l'anaphase en déphosphorylant la sororine (D'après Liu et al., 2013).

Les chromosomes qui entrent en prométaphase interagissent avec les microtubules du fuseau mitotique. Le maintien des cohésines aux centromères facilite l'attachement des chromatides sœurs aux microtubules via leurs kinétochores. Lorsque tous les chromosomes sont correctement bi-orientés sur le fuseau mitotique, l'ensemble des cohésines restantes doivent être clivées pour permettre la séparation définitive des chromatides sœurs et leur migration vers chacun des pôles de la cellule. Le clivage de deux sites de la sous-unité RAD21 est catalysé par une protéase, la séparase (Hauf et al., 2001). L'action de la séparase est inhibée par la sécurine, une protéine chaperone qui agit comme un pseudo-substrat de la protéase (Morales and Losada, 2018). Enfin, l'activation du complexe APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) permet de libérer la séparase de la sécurine (Losada and Hirano, 2005).

2. Translocation des complexes

Nous avons vu que les cohésines pouvaient être chargées le long des bras des chromosomes, au niveau des sites promoteurs. De multiples évidences expérimentales permettent de proposer un processus de translocation des cohésines le long de l'ADN.

Dans les cellules humaines, de nombreuses études ont suivi la localisation des composants des cohésines avec celle de différents sites d'ADN. Par exemple, une grande partie des sites d'accumulation des cohésines coïncide avec les sites de liaison du régulateur transcriptionnel CTCF, et sont probablement distincts des sites de chargement initiaux (Wendt et al., 2008; Parelho et al., 2008; Kagey et al., 2010). CTCF est une protéine architecturale, qui se lie directement à l'ADN génomique, et contribue à l'organisation topologique du génome en permettant notamment des rapprochements entre des régions éloignées du génome (Wang and

Dostie, 2017). CTCF a initialement été caractérisé comme un facteur de transcription. Puis il a été mis en évidence que les sites de liaison de CTCF le long du génome servaient en fait d'éléments de barrière dits « insulateurs » (Ghirlando and Felsenfeld, 2016).

Le terme « insulateur » est le nom donné à une classe d'éléments qui possèdent la capacité commune de protéger les gènes de signaux émanant de leur environnement voisin. Ces insulateurs peuvent être divisés en deux classes selon leur mode de fonctionnement. La première catégorie permet de bloquer l'action d'un enhancer situé à distance d'un promoteur. L'insulateur n'agit alors que s'il est physiquement positionné entre l'enhancer et le promoteur. La deuxième fonction d'un insulateur est d'agir comme un élément physique de barrière. L'élément de barrière va par exemple empêcher l'avancée de la chromatine condensée située à proximité du gène, permettant ainsi l'expression du gène (qui aurait été sinon inhibée/bloquée par la chromatine condensée). Certains insulateurs, tel que le facteur CTCF, peuvent partager ces deux types de fonctions et donc appartenir aux deux catégories (West et al., 2002).

Comment les cohésines se déplacent des sites promoteurs vers les sites de liaison à CTCF reste une question énigmatique. Récemment, en utilisant l'imagerie de molécule unique, une équipe a montré que les cohésines peuvent rapidement diffuser sur l'ADN. Ce « glissement » peut surmonter la présence de certaines protéines liées à l'ADN ou les nucléosomes, mais son mouvement est gêné par la transcription et le facteur CTCF (Davidson et al., 2016). Cette relation étroite entre les cohésines et CTCF s'intègre notamment avec le modèle d'extrusion de boucle, proposé pour expliquer comment deux molécules d'ADN peuvent se retrouver encerclées par un anneau de cohésines. Le clivage de RAD21 arrête également le « glissement » du complexe, confirmant que les cohésines sont topologiquement liées à l'ADN (Davidson et al., 2016).

D'autres études corroborent l'existence d'un phénomène dynamique de translocation. Par exemple, la faible co-localisation de NIPBL et des cohésines le long du génome suggère un mouvement des cohésines loin de ses sites de chargement. L'enzyme ARN polymérase II pourrait avoir un rôle dans cette dynamique. Cette enzyme, capable de bouger à une vitesse de quelques kb par minute, serait capable de pousser/entraîner les cohésines avec elle lors de son passage (Busslinger et al., 2017).

III. Rôles physiologiques des complexes SMC

La cohésion des chromatides sœurs est critique pour tous les organismes, et doit être maintenue jusqu'à la ségrégation des chromosomes à la fois pendant la mitose et pendant la méiose. Une altération de cette cohésion peut entraîner une instabilité du génome, des défauts de réparation de l'ADN ou des translocations chromosomiques.

1. Le rôle des cohésines dans la méiose

Le processus méiotique, bien que similaire à la mitose, est chargé de générer des cellules haploïdes au lieu de cellules diploïdes. La méiose est constituée de deux cycles de division (méiose I et méiose II), après un unique cycle de réplication. Chez les mammifères la méiose mâle aboutira à 4 gamètes haploïdes différents, les spermatides. A l'inverse, la méiose chez les femelles donne naissance à un seul gamète haploïde, l'ovocyte, ainsi qu'à 3 corps polaires. Les chromosomes homologues paternels et maternels sont séparés dans des directions opposées pendant la méiose I (méiose réductionnelle). Cette phase permet de réduire le nombre de chromosomes dans chaque cellule, et génère des gamètes ne possédant qu'une copie complète du génome. La deuxième méiose (méiose équationnelle) sépare les paires de chromatides sœurs, de façon similaire à la mitose (Brooker and Berkowitz, 2014).

La méiose I est un processus unique puisqu'elle doit tirer les kinétochores des chromosomes paternels et maternels dans des directions opposées et effectuer un brassage génétique considérable. La RH est alors essentielle, et va permettre de générer de nouvelles combinaisons d'allèles. La RH pendant la méiose I (recombinaison méiotique) permet l'échange d'ADN entre les chromatides paternels et maternels grâce à des « cross-overs ». La cohésion le long des bras des chromatides sœurs permet de garder ensemble les chromosomes homologues jusqu'à l'anaphase I (Figure IV.6) (Brooker and Berkowitz, 2014). Contrairement à la mitose où les chromatides sont bi-orientés, les kinétochores de chaque paire de chromosomes sont mono-orientés avec la même polarité pendant la méiose I. Pendant la méiose II, de façon similaire à la mitose, les chromatides sœurs sont bi-orientés et migreront vers les pôles opposés en anaphase. La distinction de régulation entre les bras et les centromères des chromosomes est encore plus cruciale en méiose qu'en mitose. En méiose, la cohésion des bras est dissoute en anaphase I et maintenue aux centromères, et cette cohésion des centromères persiste jusqu'à l'anaphase II (Losada and Hirano, 2005).

Une différence notable entre la cohésion des chromatides au cours de la mitose et de la méiose est la composition des complexes impliqués (Figure IV.6). Les eucaryotes supérieurs possèdent trois homologues de SCC3 : SA1, SA2 et SA3 (aussi connus comme STAG1, STAG2 et STAG3). Les formes SA1 et SA2 sont spécifiques de la mitose, tandis que SA3 intervient au cours de la méiose. De même, SMC1 existe sous la forme de deux homologues. SMC1 α peut être retrouvé pendant la mitose et la méiose, tandis que SMC1 β est spécifique de la méiose. Enfin la kléistine RAD21, retrouvée en mitose, est remplacée par REC8 pendant la méiose (Brooker and Berkowitz, 2014).

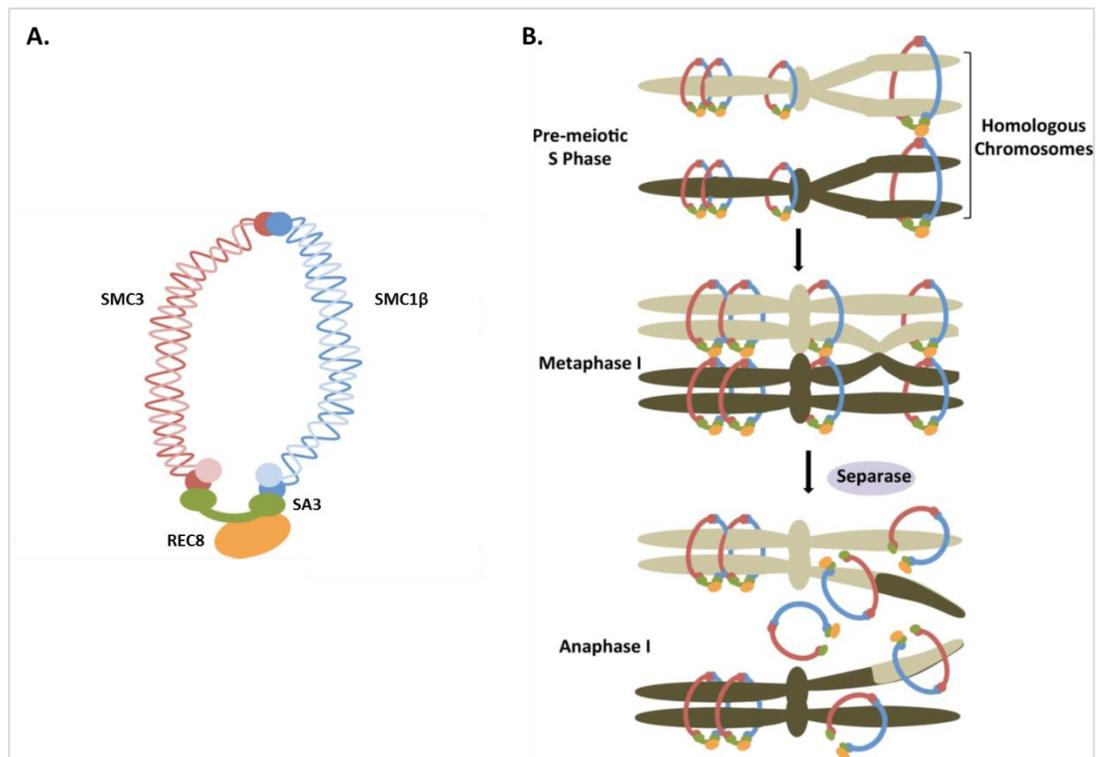


Figure IV.6 : Rôle des cohésines pendant la méiose I. A) Composition du complexe cohésines impliqué dans la méiose. Les sous-unités SMC1 β , SA3 et REC8 remplacent respectivement les sous-unités SMC1 α , SA1/2 et RAD21 présentes dans la mitose. B) Le clivage de REC8 en anaphase permet la séparation des chromosomes homologues. La cohésion au niveau des centromères est cependant maintenue afin d’assurer la bi-orientation correcte des chromatides sœurs en méiose II. Les chromosomes homologues paternels et maternels sont représentés en couleur marron clair et foncé respectivement (Adapté d’après Brooker and Berkowitz, 2014).

2. Cohésines et régulation de l’expression de gènes

Bien que leur rôle soit crucial pendant le cycle cellulaire, les cohésines sont aussi présentes en dehors de la mitose, où il n’y a donc pas de chromatides sœurs à maintenir ensemble. Les rôles de ces complexes en interphase sont multiples, et de plus en plus d’études mettent en évidence l’intervention des cohésines dans la régulation d’expression des gènes. L’utilisation de nouvelles méthodes d’investigation telles que la technique Hi-C (méthode de capture de la conformation des chromosomes), ou l’exploration du génome et des interactions ADN – protéines par ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation – sequencing) ont permis de faire de grandes avancées dans la compréhension des rôles hors mitose de ces complexes cohésines. Aujourd’hui, tout porte à croire que les cohésines forment des interactions le long des chromosomes, et peuvent réguler l’expression des gènes en association avec CTCF, le Médiateur de la transcription ou des facteurs de transcription tissu-spécifiques.

a. Les cohésines facilitent l'activation de la transcription

Les facteurs de transcription contrôlent la régulation des gènes à travers de multiples interactions avec des co-activateurs, et peuvent parfois se trouver à de très longues distances des sites promoteurs. L'activation des gènes nécessite la formation de boucles, servant à rapprocher les facteurs de transcription liés aux séquences enhancers, et les facteurs généraux situés sur les sites promoteurs. Des expériences de 3C (capture de conformation des chromosomes) ont montré que les cohésines peuvent faciliter les contacts entre enhancers et promoteurs, favorisant ainsi l'activation de gènes dans de nombreux types cellulaires : gènes de pluripotence dans des cellules souches embryonnaires de souris, gènes de la β -globine dans des cellules érythroïdes murines et humaines, ou encore gène du récepteur des cellules T dans des thymocytes de souris (Kagey et al., 2010; Seitan et al., 2011; Chien et al., 2011). La liaison des cohésines et les phénomènes de boucle entre promoteur et enhancer sont spécifiques des cellules présentant des gènes actifs (Dorsett and Ström, 2012). Le mécanisme par lequel les cohésines facilitent les contacts enhancer – promoteur ne sont pas connus à ce jour. Cependant, étant donné le rôle des cohésines dans la mitose, on peut supposer que les cohésines gardent ces deux sites proches l'un de l'autre d'une façon similaire aux chromatides sœurs, en capturant les brins d'ADN.

Dans des cellules ES murines (cellules souches embryonnaires), il a été montré que le Médiateur et les cohésines sont physiquement et fonctionnellement connectés. Ces deux complexes sont co-localisés, entre eux et avec les sites promoteurs et enhancers de gènes actifs (Kagey et al., 2010; Hnisz et al., 2013). Le Médiateur, un co-activateur de la transcription, est connu pour se lier à l'ARN polymérase, et réguler l'activation ou la répression de la transcription à différents niveaux (le fonctionnement du Médiateur fait l'objet du chapitre suivant) (Conaway and Conaway, 2011). L'hypothèse serait alors que le Médiateur s'associe avec le complexe des cohésines, ce qui favorise la formation d'une boucle permettant de rapprocher les séquences enhancers des promoteurs qu'ils régulent (Figure IV.7). Cette hypothèse a pu être confirmée par des techniques de 3C (Kagey et al., 2010).

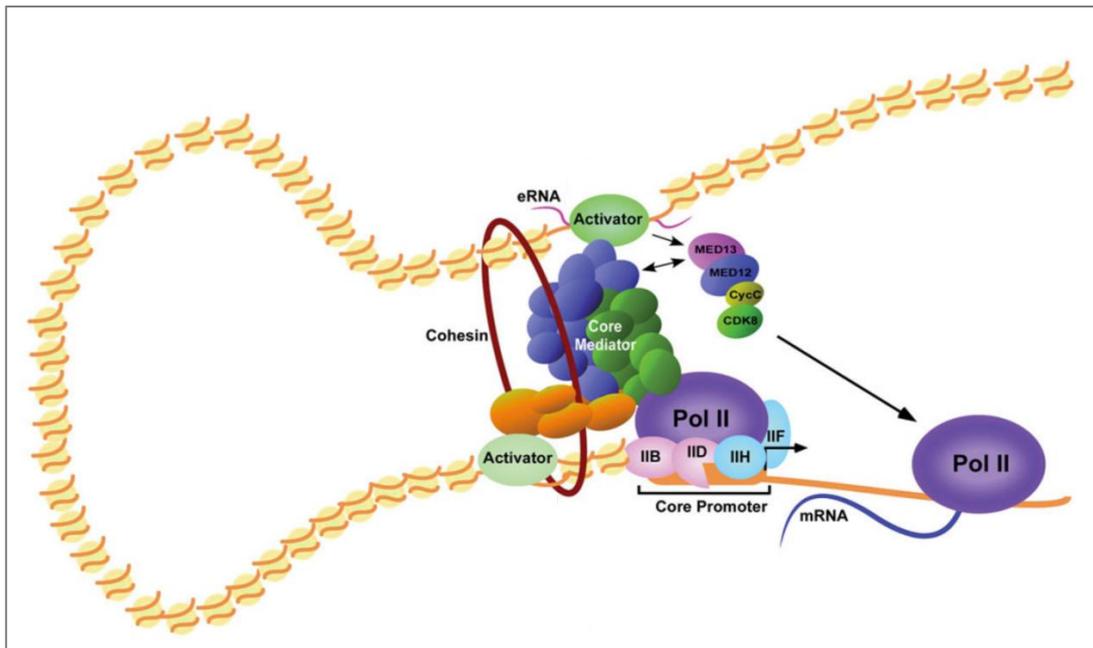


Figure IV.7 : Lien physique et fonctionnel entre les cohésines et le Médiateur de la transcription (Adapté d'après Clark et al., 2015).

Le facteur de chargement des cohésines NIPBL est co-localisé avec les cohésines et également avec le Médiateur, fournissant probablement un moyen aux cohésines de se fixer sur les sites promoteurs (Kagey et al., 2010). Dans cette étude, il a été montré que les cohésines maintiennent la pluripotence des cellules ES, en facilitant les contacts enhancers – promoteurs, permettant ainsi l'activation de gènes tels que *nanog* et *oct4* (Kagey et al., 2010). Il a également été montré que les cohésines s'associent aux sites de liaison des facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2 (Kagey et al., 2010 ; Nietzsche et al., 2011). Or, Nanog interagit avec les cohésines et la protéine WAPL, suggérant que le recrutement via des facteurs de transcription pourrait être un des mécanismes par lequel les cohésines interviennent dans la transcription de certains gènes (Nitzsche et al., 2011).

b. Cohésines et CTCF

Une autre hypothèse concernant la présence et la fonction des cohésines en dehors de la mitose, est son association avec le facteur CTCF. La répartition des cohésines dans le génome a fait l'objet de nombreuses recherches. Il a pu être montré que 50% des cohésines sont localisés dans des régions intergéniques, 37% dans des introns et des exons, et 7% dans les 5 kb en amont des promoteurs (Wendt et al., 2008). Parmi toutes les cohésines liées à l'ADN, entre 60 et 80% sont colocalisées avec le facteur CTCF (Wendt et al., 2008; Parelho et al., 2008; Schmidt et al., 2010; Kagey et al., 2010). Cependant, en absence de CTCF, les cohésines ne sont plus retrouvées aux sites de fixation de CTCF, mais la quantité de cohésines présentes sur la chromatine n'est pas affectée (Wendt et al., 2008). Ceci suggère que la localisation des cohésines sur des séquences d'ADN spécifiques dépendrait d'interactions établies avec des protéines qui elles-mêmes reconnaissent des séquences spécifiques de l'ADN.

La cartographie des interactions chromatinienne à l'échelle du génome par Hi-C a révélé une organisation des fibres de chromatine en domaines topologiques, appelés TADs (Topologically Associating Domains) (Dixon et al., 2012). Les cohésines et le facteur CTCF sont enrichis aux frontières des domaines TADs, suggérant un rôle dans la définition de ces domaines et donc dans l'organisation 3D du génome humain (Zuin et al., 2014). Dans cette étude les auteurs ont supprimé soit les cohésines soit CTCF dans des cellules humaines HEK293T, et ont suivi les changements d'organisation des chromosomes par des techniques de Hi-C et 4C. L'altération du complexe des cohésines par clivage protéolytique mène alors à une perte d'interaction avec la chromatine de courte portée. Cependant, cette perte d'interaction n'est pas accompagnée d'une décomposition de l'organisation topologique en domaines. La déplétion du facteur CTCF réduit aussi les interactions intra-domaines, mais contrairement aux cohésines, cela mène aussi à une augmentation des interactions entre domaines voisins. Les auteurs proposent alors le modèle suivant : les cohésines seraient principalement impliquées dans les interactions chromatinienne au sein des domaines topologiques, tandis que CTCF serait important pour la ségrégation spatiale de ces domaines (Zuin et al., 2014). Autrement dit, CTCF est lié de façon stable à la chromatine et maintient les frontières des TADs en déterminant la localisation des cohésines. En absence de CTCF, les cohésines ne sont plus localisées correctement le long du génome, et forment ainsi des interactions non spécifiques qui n'ont plus aucune barrière. Il a de plus été montré que la dynamique de liaison à l'ADN de CTCF est supérieure à celle des cohésines, avec des temps de résidence sur la chromatine de 1-2 min versus 22 min respectivement. Les protéines CTCF peuvent rapidement se lier à d'autres sites sur la chromatine, contrairement aux cohésines pour lesquelles le processus de recherche de nouveaux sites de liaison est plus long (1 min versus 33 min pour CTCF et les cohésines respectivement) (Hansen et al., 2017). Ces résultats suggèrent un complexe dynamique plutôt qu'un complexe stable, particulièrement pour les protéines CTCF.

Précédemment, le modèle « d'extrusion de boucle » (EB) a été évoqué pour expliquer comment les cohésines peuvent capturer deux brins d'ADN. Le modèle EB vise à expliquer les mécanismes qui aboutissent à l'organisation de domaines chromosomiques. Comme nous l'avons vu, dans ce modèle les domaines sont formés lorsque des facteurs d'extrusion de boucle (FEB), tels que les cohésines (et les condensines), se déplacent le long de l'ADN et rencontrent des éléments de barrière, tels que CTCF (Goloborodko et al., 2016; Barrington et al., 2017). Si l'on suit ce modèle, les FEB et donc les cohésines doivent être capables de glisser le long des chromosomes. Cette hypothèse corrobore ce que nous avons vu dans le paragraphe « Translocation des complexes cohésines ». La formation de cette boucle nécessite au minimum deux sites CTCF, et un anneau de cohésines qui rapproche les sites CTCF (Figure IV.8). Une caractéristique importante dans ce modèle est la spécificité des partenaires impliqués dans ces interactions longues distances. La sélection des partenaires est notamment expliquée par l'orientation des motifs CTCF présents aux sites d'interaction. En effet, les boucles de chromatine se forment majoritairement entre deux motifs CTCF qui convergent l'un vers l'autre (Figure IV.8) (Rao et al., 2014). Peu de choses sont connues pour l'instant sur la nature des interactions entre cohésines et CTCF. Cependant, on sait qu'il existe une interaction entre l'extrémité C-terminale de CTCF et la sous-unité SA2 des cohésines (Barrington et al., 2017).

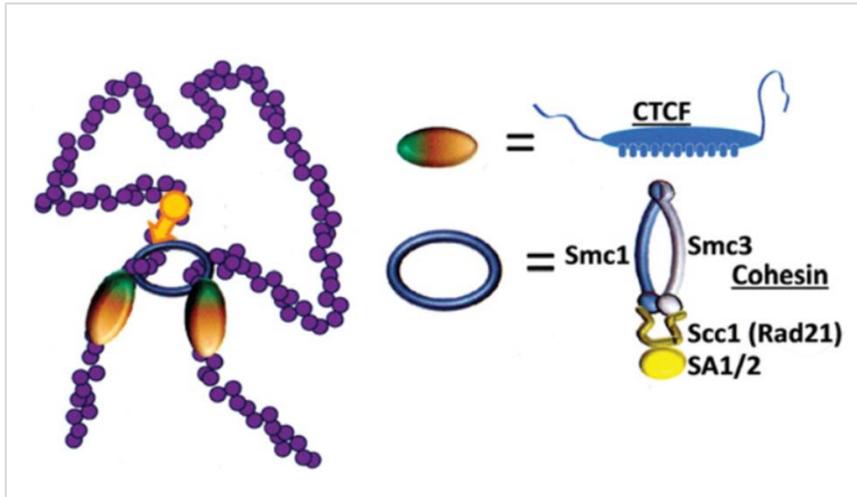


Figure IV.8 : Formation d'une boucle d'ADN grâce aux cohésines et aux motifs CTCF. Les cohésines liées à l'ADN entraînent la formation d'une boucle qui continue jusqu'à ce qu'elles rencontrent deux sites CTCF. Soit CTCF co-migre avec les cohésines, soit le facteur est déjà présent avant la liaison des cohésines. Les cohésines peuvent uniquement s'arrêter si les sites CTCF sont correctement orientés l'un envers l'autre (Adapté d'après Ghirlando and Felsenfeld, 2016).

3. Cohésines et intégrité du génome

a. La réplication

La cohésion des chromatides sœurs est particulièrement indispensable pendant la réplication. Des mutations ou des délétions dans les composants de la machine de réplication entraînent des défauts de cohésion, suggérant une relation fonctionnelle entre ces deux processus. Hormis l'acétyltransférase Eco1 (ESCO1 ou ESCO2 chez l'homme), d'autres protéines associées à la fourche de réplication interviennent dans la phase d'établissement des cohésines. Cela inclut par exemple chez la levure les complexes Ctf18-RFC et Swi1-Swi3, ainsi que les composants Ctf4 et Chl1. Succinctement, la stabilisation ou la protection des fourches de réplication nécessite l'action des complexes Ctf19-RFC, Swi1-Swi3 et Chl1, tandis que Ctf4 s'associe avec les origines de réplication et l'ADN polymérase α , et bouge le long des chromosomes avec la machine de réplication (Brooker and Berkowitz, 2014). Aucun de ces composants n'est essentiel pour la survie cellulaire, mais une délétion dans n'importe lequel d'entre eux entraîne une diminution de l'acétylation de SMC3 et compromet l'établissement des cohésines entre les chromatides sœurs (Uhlmann, 2016). Cohésion et réplication sont donc des événements intimement liés et dépendants l'un de l'autre.

b. La réparation des cassures double brin de l'ADN

Les cassures double brin (CDB) peuvent majoritairement être réparées par deux voies de réparation : la recombinaison homologue (RH) ou la religation non-homologue (NHEJ pour Non Homologous End Joining). En phase G1 du cycle cellulaire, les lésions sont principalement

réparées par le NHEJ, qui entraîne une religation de l'ADN cassé, mais mène souvent à une perte d'information génétique. A l'inverse, la RH est principalement active pendant les phases S et G2 du cycle, et nécessite la présence d'une chromatide sœur qui servira de support à la réparation. Les deux chromatides sœurs étant identiques, la RH entraîne beaucoup moins de perte de l'information génétique. La grande proximité des deux brins d'ADN cassés requise pour assurer la RH implique que les chromatides sœurs soient maintenues associées, cette fonction étant portée par les cohésines (Figure IV.9) (Dorsett and Ström, 2012). Des études chez la levure (Sjögren and Nasmyth, 2001) et chez les vertébrés (Sonoda et al., 2001) ont effectivement montré que la réparation des CDB en phase G2 est fortement altérée en absence des cohésines. L'inactivation de Eco1, qui empêche la cohésion mais pas la liaison initiale des cohésines, entraîne aussi des défauts de réparation (Dorsett and Ström, 2012). De plus la déplétion de la sororine diminue la cohésion et la réparation en phase G2, mais pas la liaison des cohésines (Schmitz et al., 2007). Tous ces résultats indiquent que les cohésines sont nécessaires pour la réparation post-réplivative des CDB.

L'accumulation des cohésines au niveau des sites de lésions induites par micro-irradiation laser a été mise en évidence dans les cellules humaines (Kim et al., 2002a). D'autre part, deux études chez la levure ont montré que les cohésines sont recrutées sur une région d'environ 100 kb autour d'une CDB (Ström et al., 2004; Ünal et al., 2004). Il est alors possible de distinguer deux populations de cohésines impliquées dans la réparation : les cohésines déjà présentes avant le dommage, et les cohésines spécifiquement recrutées au site de dommage (Ünal et al., 2004). Les cohésines spécifiquement recrutées établissent alors des liens entre la chromatide endommagée et sa chromatide sœur intacte, ce qui facilite la réparation de la cassure (Figure IV.9) (Ström et al., 2004). Le recrutement de ces cohésines aux CDB dépend de Scc2, et nécessite la phosphorylation de l'histone H2AX par les kinases Mec1/ATM et Tel1/ATR (Ünal et al., 2004).

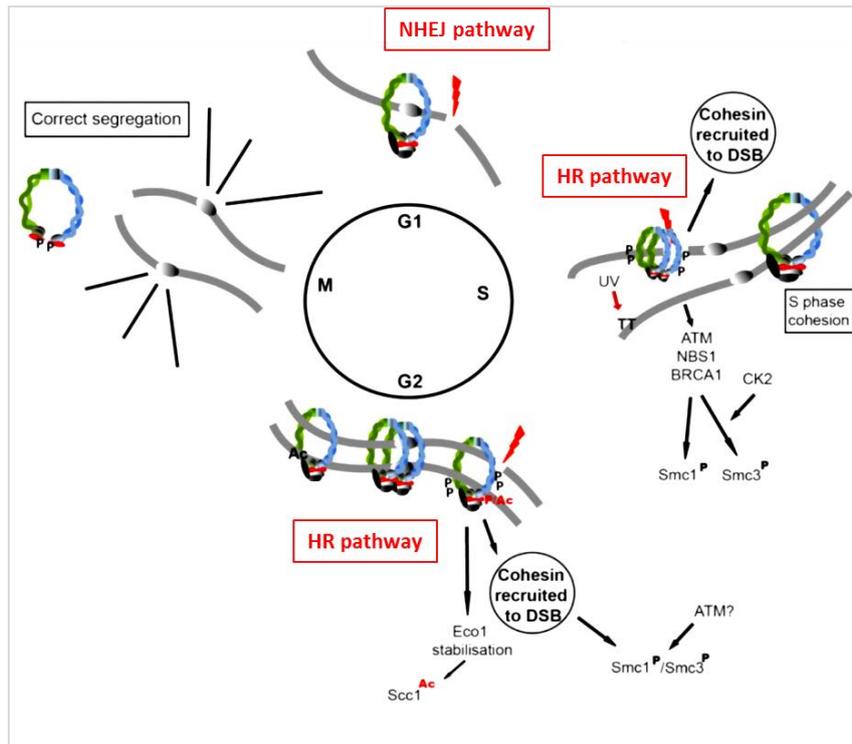


Figure IV.9 : Fonctions des cohésines dans la réparation de l'ADN. Les cassures double brin (CDB) peuvent être réparées par deux voies en fonction de la phase du cycle cellulaire : le NHEJ répare les CDB pendant la phase G1, tandis que la RH prend en charge les CDB dans les phases S et G2. Les cohésines sont recrutées sur les CDB et impliquées dans la réparation par RH en phases S et G2. DSB : Double Strand Break ; HR : Homologous Recombinaison ; NHEJ : Non-Homologous End Joining (Adapté d'après Dorsett and Ström, 2012).

La phosphorylation des sous-unités SMC semble aussi être un évènement indispensable dans la réponse aux dommages de l'ADN. Dans les cellules humaines, la phosphorylation de SMC1 sur les résidus sérine S957 et S966 en réponse aux irradiations est nécessaire pour l'activation du point de contrôle en phase S du cycle (Kim et al., 2002b; Yazdi et al., 2002). Des cellules murines exprimant une forme non-phosphorylable de SMC1 présentent une survie très diminuée et une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques après exposition aux irradiations (Kitagawa et al., 2004). La phosphorylation de la sous-unité SMC3 sur deux résidus sérines (S1083 et S1067) pourrait aussi intervenir dans ce processus de réparation (Luo et al., 2008). Même si le rôle des cohésines dans l'intégrité du génome n'est pas encore complètement compris, il est maintenant accepté que le rôle de ces complexes pendant le cycle cellulaire va bien au-delà du « simple » rôle de cohésion pendant la mitose initialement identifié.

IV. Pathologies humaines

1. Cohésinopathies

Les maladies humaines causées par des mutations dans les gènes associés au réseau des cohésines sont nommées cohésinopathies. Toutes les cohésinopathies qui ont été identifiées jusqu'à présent se manifestent comme des désordres multi-systèmes du développement, et possèdent des phénotypes bien distincts. Les cohésinopathies sont caractérisées par une grande variété de défauts du développement, tels qu'un retard de croissance et un retard mental, une déformation des membres, et des anomalies crânio-faciales. Ces phénotypes sont cohérents avec le rôle des cohésines pendant l'embryogenèse. Les mécanismes moléculaires sous-jacents, pouvant expliquer les changements dans l'expression des gènes capables d'entraîner ces cohésinopathies, sont mal connus. Différents mécanismes ont été proposés, tel que l'action des cohésines dans les interactions enhancer – promoteur, l'activation ou la répression de la transcription, ou l'association avec CTCF (Brooker and Berkowitz, 2014). On note que ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs, et qu'une combinaison d'évènements pourrait probablement en être la cause.

Le syndrome de Cornelia de Lange (CDLS) est un désordre du développement multi-système, à transmission dominante, et caractérisé par des anomalies faciales, des malformations des extrémités supérieures, un hirsutisme (pilosité excessive), des défauts cardiaques, un retard de croissance et un retard cognitif, ainsi que des anomalies gastro-intestinales. Les défauts cognitifs et de comportement peuvent être plus ou moins sévères. Les malformations des membres peuvent concerner quelques doigts ou l'ensemble des membres supérieurs et inférieurs (Brooker and Berkowitz, 2014). Le CDLS est causé par des mutations ponctuelles ou de petites délétions / insertions dans un des deux allèles des gènes *SMC1*, *SMC3*, et plus majoritairement *NIPBL* (plus de 60% des cas). Plus tardivement, des mutations dans les gènes *HDAC8* et *RAD21* ont également été mises en cause dans ce syndrome (Tableau IV.1) (Watrin et al., 2016).

Tableau IV.1 : Liste des gènes dont les mutations peuvent causer un syndrome de Cornelia de Lange. Le symbole du gène, la localisation génomique, le nom de la protéine codée et la proportion des patients atteints de CDLS pour chaque type de mutation sont indiqués (Adapté d'après Watrin et al., 2016).

Gene symbol	Locus	Protein name	CdLS cases
<i>NIPBL</i>	5p13.2	Nipped-B-like protein	65%
<i>SMC1A</i>	Xp11	Structural maintenance of chromosomes 1A	5%
<i>SMC3</i>	10q25.2	Structural maintenance of chromosomes 1A	<1%
<i>HDAC8</i>	Xq13.1	Histone deacetylase 8	~5%
<i>RAD21</i>	8q24.11	Double-strand break repair protein Rad21 homolog	<1%

Etonnamment, des lignées cellulaires de patients atteints de CDLS ne montrent pas de défauts de cohésion évidents (Kaur et al., 2005). Cependant, les cellules de patients CDLS présentent une augmentation de la sensibilité aux dommages de l'ADN. Par exemple, une

exposition aux rayons X entraîne une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques, mais seulement dans les cellules irradiées en phase G2 du cycle. La réparation en phase G1 ne semble pas altérée (Vrouwe et al., 2007). Ces résultats sont cohérents, puisque les cohésines ont un rôle crucial dans la réparation des CDB en phases S et G2 du cycle.

Le syndrome de Roberts (SR) et la phocomélie sont également des désordres multi-systèmes, rares, avec une transmission récessive. Ils se manifestent par une malformation des membres et des os pelviens, des malformations crâniennes, ainsi que des troubles cardiaques et cognitifs. Ces deux syndromes sont similaires, mais la phocomélie représente un phénotype moins sévère que le SR (Brooker and Berkowitz, 2014). L'analyse de chromosomes en métaphase de patients atteints du SR révèle un manque de cohésion dans les régions autour des centromères, et dans la région distale sur le bras long du chromosome Y (Schüle et al., 2005). Ces deux syndromes sont causés par des altérations des deux allèles du gène *ESCO2*. Dans la majorité des cas, les mutations correspondent à des troncations, bien qu'au moins deux mutations ponctuelles présentes dans le domaine catalytique de l'enzyme et pouvant altérer l'activité acétyltransférase de *ESCO2* ont aussi été identifiées (Vega et al., 2010). La majorité de ces mutations entraînent des quantités très faibles ou indétectables de l'ARNm du gène *ESCO2*. Bien que deux gènes existent chez l'humain, *ESCO1* et *ESCO2*, seul *ESCO2* serait impliqué dans le SR et la phocomélie.

2. Autres syndromes multi-systèmes

D'autres syndromes sont directement liés à des formes variants de protéines appartenant au complexe des cohésines. Les déficiences en *PDS5* par exemple, se caractérisent de façon similaire au CDLS. Des souris déficientes en *PDS5A* ou *PDS5B* naissent avec des anomalies congénitales multiples, dont un retard de croissance, une fente palatine (« bec-de-lièvre »), des défauts cardiaques, et décèdent dès la naissance (Zhang et al., 2007). Le rôle de cette protéine dans les maladies humaines reste difficile à étudier, probablement à cause de son rôle essentiel, comme le traduit le décès prématuré des cellules portant ces mutations.

Le syndrome alpha-thalassémie/retard mental lié à l'X ou syndrome ATRX est une forme rare (transmission récessive) de retard mental ne touchant que les hommes. Ce désordre multi-systèmes est caractérisé par un déficit de croissance post-natal, un retard mental, une microcéphalie, des dysmorphies crânio-faciales, des anomalies génitales, des crises d'épilepsies et une thalassémie alpha (Brooker and Berkowitz, 2014). Le syndrome ATRX est causé par des mutations dans le gène *ATRX*, situé sur le chromosome X, et entraîne un défaut de cohésion dans des cellules de mammifères où le gène en *ATRX* est manquant. Le gène *ATRX* code pour une protéine de remodelage de la chromatine très enrichie dans l'hétérochromatine péri-centromérique, dans les cellules murines et humaines, et s'associe avec la protéine HP1 α (Ritchie et al., 2008). Dans les cellules humaines, ATRX est nécessaire pour une progression mitotique normale. La transition entre la prométaphase et la métaphase est prolongée dans les cellules manquantes en ATRX, et accompagnée d'un défaut de cohésion des chromatides sœurs et de formation de la plaque métaphase. Une perte d'ATRX dans les cerveaux embryonnaires

de souris induit aussi des défauts de mitose dans les progéniteurs neuronaux *in vivo* (Ritchie et al., 2008). Le syndrome ATRX ne touche donc pas directement une protéine impliquée dans le complexe des cohésines, mais est caractérisé d'un point de vue phénotypique par un défaut de cohésion, d'où son lien potentiel avec les cohésines.

3. Anomalies chromosomiques et fertilité

Les anomalies chromosomiques chez l'homme représentent la cause principale des défauts à la naissance, ainsi que la cause majeure de fausses couches. Le nombre de trisomies augmente drastiquement chez les femmes de plus de 40 ans. Les raisons précises de cette augmentation du risque d'aneuploïdie avec l'âge ne sont pas totalement comprises à ce jour. Cependant, vu le rôle essentiel des cohésines dans la ségrégation des chromosomes, en mitose et en méiose, celles-ci apparaissent logiquement comme des candidats pouvant partiellement expliquer ce processus. Il a donc été proposé que la corrélation que l'on retrouve entre l'âge et le risque d'aneuploïdie résulterait d'une perte de cohésion (Brooker and Berkowitz, 2014).

Des souris déficientes en SMC1 β ont fourni la première évidence directe d'un lien entre cohésion des chromosomes et fertilité. En effet les souris déficientes en SMC1 β mâles et femelles sont stériles (Revenkova et al., 2004). La même équipe a montré quelques années plus tard qu'une déplétion de SMC1 β après la période néonatale, la protéine étant alors uniquement produite pendant le développement fœtal, n'affecte pas la fertilité. Ces résultats indiquent qu'une fois que la cohésion est établie dans les ovocytes pendant la période fœtale, il n'y a aucun ou très peu de renouvellement des cohésines jusqu'à la période de fertilisation (Revenkova et al., 2010).

L'association possible entre une dégradation des cohésines dépendante de l'âge et le risque d'aneuploïdie a été examinée chez des souris femelles. La cohésion des centromères a été comparée en examinant la distance entre les kinétochores sœurs dans des ovocytes jeunes et vieux (Chiang et al., 2010). L'étude des ovocytes en métaphase I et II a montré une augmentation de la distance entre les kinétochores dans les ovocytes vieux par rapport aux ovocytes de souris jeunes, suggérant une perte de cohésion aux centromères liée à l'âge. La même étude a montré une réduction du marquage de REC8 chez les vieilles souris par rapport aux plus jeunes. Ces études chez la souris ont cependant été controversées par des recherches chez l'homme. Dans des ovocytes de femmes âgées de 18 à 34 ans, aucune différence de marquage de REC8, SMC3 ou SA3 n'a été retrouvée, et les niveaux d'expression de l'ARNm de SMC1 β sont comparables (Garcia-Cruz et al., 2010). Des évidences directes d'un lien entre la perte de cohésines, dépendante de l'âge, et des perturbations de l'oogenèse restent encore à être trouvées. Les raisons d'une aneuploïdie liée à l'âge sont donc toujours inconnues, même si le rôle des cohésines pourrait vraisemblablement être un facteur important.

4. Cohésines et cancer

Un nombre croissant de mutations retrouvées dans les protéines des complexes cohésines sont associées aux cancers. Notamment, des mutations dans les sous-unités SA2, RAD21, SMC1 et SMC3 ont été observées dans différents types de leucémies (Kon et al.,

2013). Des mutations de la sous-unité SA2 sont aussi retrouvées dans le cancer de la vessie et les cancers colorectaux (Solomon et al., 2013; Cucco et al., 2014). Des fluctuations de la quantité de certaines protéines pourraient également informer sur le pronostic de certains cancers. Par exemple, une augmentation de l'expression de RAD21 serait associée à un mauvais pronostic dans certains types de cancers du sein (cancers du seins BRCA2 et BRCA1) (Yan et al., 2012). Les mécanismes pouvant expliquer le rôle des cohésines dans ces cancers sont toujours mal compris. Connaissant leur rôle dans la réparation de l'ADN, on peut supposer qu'un défaut dans ces complexes pourrait logiquement augmenter l'instabilité du génome et le nombre d'aberrations chromosomiques, et donc favoriser le processus de tumorigenèse. Cependant, il est important de garder en mémoire que les patients atteints de CDLS possèdent certaines de ces mutations, sans présenter de risque accru de cancer. De plus, les cellules cancéreuses portant ces mutations n'ont pas nécessairement de caryotypes aberrants (Kon et al., 2013).

V. Conclusion générale du chapitre IV

Les cohésines sont des complexes essentiels conservés chez l'ensemble des organismes. Initialement identifiées pour leur rôle dans la mitose, il est maintenant évident que ces complexes interviennent dans d'autres processus, tels que la régulation des gènes et la réparation de l'ADN. Leur rôle dans la réparation est pour l'instant limité à la RH, particulièrement pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire. Mais les cohésines peuvent également intervenir en dehors du cycle cellulaire, notamment dans la régulation de l'expression des gènes. Nous avons vu qu'elles pouvaient s'associer avec le Médiateur de la transcription, mais aussi avec le facteur CTCF. L'analyse de leur répartition le long du génome par ChIP-seq (Kagey et al., 2010) a révélé une co-localisation très particulière de ces complexes avec le Médiateur et CTCF. D'après cette étude, les cohésines co-localisent soit avec le Médiateur, soit avec les sites CTCF, mais jamais avec les deux en même temps. Par déduction, Médiateur et CTCF semblent ne jamais co-localiser au sein du génome. De plus, NIPBL co-localise avec les cohésines associées uniquement au Médiateur, tandis que les sous-unités SA1/SA2 co-localisent avec les cohésines associées au CTCF. Ces analyses confirment donc un rôle probablement bien distinct des cohésines en fonction des protéines avec lesquelles elles sont associées.

Chapitre V - Le Médiateur de la transcription

Nos études nous ont amené à étudier le rôle du Médiateur et des cohésines dans la réparation des dommages oxydatifs. Bien que ces deux complexes aient été associés avec certaines voies de réparation, aucune étude n'a pour l'instant montré leur rôle dans la réparation par le BER. Nous venons de voir que les cohésines avaient de multiples rôles, notamment en interphase dans la réparation des CDB. Ce chapitre est maintenant dédié au Médiateur de la transcription, afin de mieux comprendre comment ce complexe, initialement connu pour son rôle dans la transcription, pourrait intervenir dans la réparation de l'ADN, de concert avec les cohésines.

I. La transcription

Au sein de notre organisme l'expression de l'information génétique commence par l'étape de transcription, un processus qui permet aux gènes portés par l'ADN d'être codés sous la forme d'ARN messagers (ARNm). Ceux-ci sont ensuite reconnus par les complexes de traduction, responsables de la synthèse de protéines.

Chez les eucaryotes, la transcription a lieu dans le noyau cellulaire. La synthèse des ARNm par l'ARN polymérase nécessite de multiples points de régulation, et implique différents types d'acteurs. La conversion d'une molécule d'ADN en ARNm fait intervenir l'ARN polymérase, des facteurs généraux de la transcription (FGT), des facteurs spécifiques de la transcription (FST), ainsi que des co-activateurs de la transcription. Tous ces acteurs entrent en jeu à des moments précis du processus, et possèdent des rôles distincts qui seront détaillés dans la suite de ce chapitre. Le rôle du Médiateur sera davantage décrit, ce co-activateur possédant une place centrale dans mon projet de recherche.

1. Les acteurs de la transcription

a. Le promoteur et les séquences régulatrices

Les promoteurs des gènes codants les protéines possèdent des caractéristiques communes. Ils sont composés d'un site d'initiation de la transcription et d'une boîte TATA. La région cœur du promoteur comprend le site d'initiation de la transcription et la boîte TATA et s'étend sur environ 100 pb. La boîte TATA est une séquence enrichie en A/T, localisée 25 à 30 nucléotides en amont du site d'initiation chez les eucaryotes supérieurs, et 40 à 120 nucléotides chez la levure. La boîte TATA sert de site de liaison à la protéine TBP (TATA-Binding Protein), une des sous-unités du facteur TFIID (Lee and Young, 2000).

Le début de la transcription est modulé par la liaison de FST sur des séquences régulatrices positives (enhancers) ou négatives (silencers) sur lesquelles se lient,

respectivement, des activateurs ou des répresseurs (FST). Les séquences enhancers peuvent être localisées à de très grandes distances du site d'initiation de la transcription: à des centaines de bases chez la levure, jusqu'à plusieurs mégabases chez les métazoaires (Sanyal et al., 2012). Nous verrons par la suite que le Médiateur sert de pont entre les FST liés aux séquences enhancers et le site promoteur d'un gène. Les séquences enhancers sont occupées par des nucléosomes avec des modifications spécifiques, et sont sensibles à des traitements par DNase. Ces caractéristiques sont utilisées pour identifier des enhancers potentiels quand les régulateurs ne sont pas connus. Une étude à l'échelle du génome, sur 125 types cellulaires, a permis d'identifier environ 1 million d'enhancers possédant ces caractéristiques (Thurman et al., 2012).

b. L'ARN polymérase II

La transcription du génome eucaryote est prise en charge par des ARN polymérases. Trois ARN polymérases principales existent chez les eucaryotes : l'ARN Pol I, Pol II, et Pol III. L'ARN Pol I transcrit les précurseurs des ARNr, et la Pol III transcrit les petits ARN non codants, tels que les ARNt. L'ensemble des gènes codants les protéines est transcrit par l'ARN Pol II, une enzyme composée de 12 sous-unités, notées Rpb1 à Rpb12 (Lee and Young, 2000; Sainsbury et al., 2015). Les gènes codants ces 12 sous-unités sont très bien conservés au cours de l'évolution d'un point de vue structural et fonctionnel (Lee and Young, 2000). Rpb1, la plus grande sous-unité (217 kDa), est le siège de l'activité catalytique. Rpb1 contient également le module CTD (C-Terminal Domain), composé de répétitions en tandem de la séquence consensus suivante : Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. La présence du module CTD est une caractéristique unique de l'ARN Pol II qui permet de la distinguer des autres polymérases. Le CTD est conservé des champignons à l'homme, bien que le nombre de répétitions de la séquence consensus varie d'un organisme à l'autre, allant de 26 chez la levure, à 52 chez l'homme (Lee and Young, 2000; Hsin and Manley, 2012). L'activité de l'ARN Pol II est modulée par l'état de phosphorylation du CTD. Les molécules d'ARN Pol II associées à un CTD non phosphorylé sont retrouvées au niveau du complexe d'initiation, tandis que les molécules de polymérases en élongation contiennent des CTD fortement phosphorylés (Dahmus, 1996).

Deux kinases sont connues pour phosphoryler les résidus sérine du domaine CTD. La sous-unité CDK7 (Cyclin-Dependent Kinase 7, aussi connue sous le nom Kin28 chez la levure) du facteur TFIIH, en phosphorylant le CTD, permet de passer de l'étape d'initiation à une élongation stable (Dvir et al., 1997). Le Médiateur stimule la phosphorylation du domaine CTD par la kinase CDK7, permettant la libération de l'ARN Pol II du site promoteur (Boeing et al., 2010). Une sous-unité du Médiateur, la kinase CDK8 (Srb10 chez la levure), pourrait également phosphoryler le domaine CTD. Cette phosphorylation agirait comme une régulation négative de la transcription (Holstege et al., 1998). La régulation de la transcription par le module CDK du Médiateur (comprenant entre autres la sous-unité CDK8) est détaillée dans la section *II.2.a.iv « Rôle particulier du module CDK »*.

c. Les facteurs généraux

L'ARN Pol II à elle seule ne suffit pas à initier la synthèse des ARNm, les facteurs généraux de la transcription (FGT) sont également requis. Les FGT sont composés des facteurs TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH, qui s'associent aux sites promoteurs pour former le complexe de pré-initiation (CPI). Les FGT coopèrent avec l'ARN Pol II pour se lier au promoteur et l'ouvrir, initier la synthèse de l'ARNm, et stimuler la libération de l'ARN Pol II du promoteur (Sainsbury et al., 2015). La séquence d'évènements faisant intervenir chacun de ces FGT sera décrite dans le paragraphe « Formation du complexe de pré-initiation ».

d. Les facteurs spécifiques de la transcription

Les FST sont classés en fonction de la nature de leur domaine activateur, qui reconnaît soit un co-facteur soit un FGT, et de leur domaine de liaison à une séquence spécifique d'ADN, par exemple les séquences enhancers (Featherstone, 2002). Les FST sont nombreux, certains présentent une spécificité tissulaire et leur niveau d'expression peut être régulé (Vaquerizas et al., 2009). L'analyse de la structure de centaines de complexes ADN – protéines a permis de classer les FST en 8 groupes, en fonction de la nature de leur domaine de liaison à l'ADN (Luscombe et al., 2000). On peut citer les trois principaux types de FST retrouvés dans le génome humain : les FST contenant un domaine en doigt de zinc, des héméodomaines, et les domaines en hélice-boucle-hélice. Les FST peuvent également être classés en fonction de la composition en acides aminés de leur domaine activateur (Coin and Égly, 2000).

D'une manière générale, les activateurs peuvent agir de nombreuses façons sur la transcription (Figure V.1). Ils peuvent éliminer un répresseur, recruter et stabiliser les FGT et la Pol II, favoriser le départ du promoteur (ce qui favorise la transition entre l'initiation et l'élongation), ou induire un changement de conformation du complexe d'initiation (Coin and Égly, 2000). Cette liste n'est pas exhaustive, puisque les FST peuvent aussi par exemple recruter des remodeleurs de la chromatine tel le complexe SWI/SNF (Cosma, 2002).

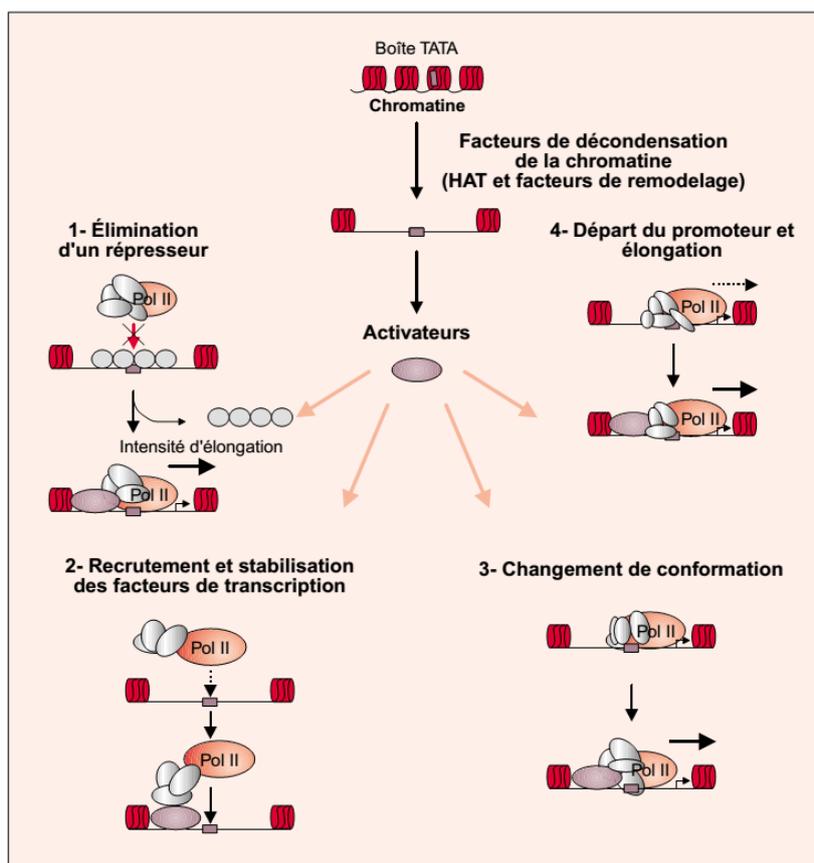


Figure V.1 : Principaux effets des activateurs sur les étapes de la transcription (D'après Coin and Égly, 2000).

e. Les co-activateurs de la transcription

La définition d'un co-activateur est avant tout fonctionnelle. Un système *in vitro* contenant l'ARN Pol II, la protéine TBP, les FGT, et une molécule d'ADN contenant une boîte TATA permet l'initiation d'un niveau basal de transcription. Cependant, une transcription dite activée (dirigée par des activateurs spécifiques), nécessite d'autres protéines, les co-activateurs (Malik and Roeder, 2000). Les co-activateurs sont recrutés sur tous les gènes régulés par un activateur donné, grâce à leur liaison avec le domaine activateur de ce dernier. Les co-activateurs sont classés en deux catégories : ceux qui font partie de la machinerie basale de la transcription, ou qui établissent des contacts avec cette machinerie, et ceux qui modifient la structure de la chromatine. La première catégorie comprend notamment les facteurs TAF et le complexe du Médiateur. La deuxième classe est composée des complexes SWI/SNF et des HAT (Featherstone, 2002). Cette classification n'est cependant pas stricte, puisque certains co-activateurs, tel que le facteur TAF_{II}250, possèdent également une activité HAT intrinsèque (Mizzen et al., 1996). Parmi tous les co-activateurs connus, le Médiateur de la transcription possède des caractéristiques uniques (notamment à cause du nombre élevé de sous-unités le composant) et dont les rôles multiples continuent encore d'être découverts. Le complexe du Médiateur étant central dans mon projet de recherche, sa structure, son rôle, ainsi que ses nombreuses fonctions sont décrits dans la suite de ce chapitre. Les principaux co-activateurs,

ainsi que leur fonction, sont présentés dans le tableau V.1. En conclusion, la caractéristique commune à tous les co-activateurs est leur capacité à faciliter les interactions entre les activateurs/répresseurs et la machinerie de transcription.

Tableau V.1 : Principaux co-activateurs chez les eucaryotes. FGT : Facteurs Généraux de la Transcription ; HAT : Histone AcetylTransferase (Adapté d'après Cosma, 2002).

Co-activateur	Fonction principale
Médiateur	Stimule la transcription en transmettant les signaux entre activateurs et FGT
AIB1	Potentiale l'activité transcriptionnelle des récepteurs hormonaux nucléaires
SWI/SNF	Complexe de remodelage de la chromatine ; Altère la structure de la chromatine et augmente l'accessibilité à l'ADN
SAGA	HAT ; Acétyle des lysines spécifiques de la queue des histones
GCN5	Sous-unité catalytique du complexe SAGA
PCAF	HAT ; Rôle dans la régulation de la transcription, la progression du cycle cellulaire et la différenciation
CBP / P300	HAT ; Fonctionnent comme des régulateurs globaux de la transcription
PRMT1	Arginine méthyltransférase ; Favorise l'activation de la transcription par les récepteurs hormonaux nucléaires

2. Formation du complexe de pré-initiation

L'initiation de la transcription nécessite l'assemblage de l'ARN Pol II avec les FGT sur le promoteur des gènes, pour former le complexe de pré-initiation (CPI). La première étape dans la formation du CPI est la liaison spécifique de la protéine TBP à la boîte TATA. Le facteur TFIID possède une place particulière dans ce complexe, puisqu'il contient à la fois la protéine TBP, ainsi que les 13 autres facteurs TAF (TBP-Associated Factors). La spécificité de liaison de la protéine TBP sur la boîte TATA provient de la tendance naturelle des sites riches en A/T à former une surface hydrophobe, complémentaire avec la TBP (Vannini and Cramer, 2012). TFIID est donc directement impliqué dans la reconnaissance du promoteur via sa liaison avec la boîte TATA. Cependant, la boîte TATA n'est retrouvée que dans 10 à 20% des promoteurs chez la levure et l'homme (Yang et al., 2007). L'analyse des séquences de nombreux promoteurs a permis d'identifier d'autres éléments du promoteur reconnus par les TAF, chaque TAF reconnaissant des éléments différents (Baumann et al., 2010). Un autre facteur, le facteur auxiliaire TFIIA participe également à la formation du CPI. TFIIA n'est pas nécessaire à la transcription basale, mais peut stabiliser le complexe TBP – ADN (Imbalzano et al., 1994).

Dans le modèle classique de formation du CPI, le complexe ARN Pol II – TFIIF se lie à un pré-complexe, formé par le promoteur – TBP – TFIIB, l'ensemble de ces éléments formant le cœur du CPI (Figure V.2). Le facteur TFIIB est nécessaire au recrutement de l'ARN Pol II sur le promoteur, et facilite la liaison de la TBP à l'ADN. TFIIB sera libéré du complexe une fois que l'ARN aura atteint une longueur de 12 – 13 nucléotides. TFIIF prévient les interactions non spécifiques de l'ARN Pol II avec l'ADN et stabilise le CPI (Sainsbury et al., 2015). Le

cœur du CPI est conservé dans les systèmes de transcription par la Pol I et la Pol III, qui utilisent également la protéine TBP, et qui possèdent des protéines homologues des facteurs TFIIB et TFIIF (Vannini and Cramer, 2012). Le cœur du CPI se lie ensuite aux facteurs TFIIE et TFIIH, pour former un CPI complet qui contient un promoteur d'ADN double-brins, encore en configuration fermée (Figure V.2). En présence d'ATP, la région au centre du CPI s'ouvre et forme une « bulle de transcription ». Les facteurs TFIIE et TFIIH sont indispensables à l'ouverture du promoteur. TFIIH contient une activité ATPase nécessaire à l'initiation. TFIIE quant à lui facilite le recrutement de TFIIH sur le complexe d'initiation, formant un pont entre l'ARN Pol II et TFIIH. Une fois que la bulle de transcription est ouverte et prête à fonctionner, la synthèse de l'ARN est initiée en présence de nucléosides triphosphates (Sainsbury et al., 2015).

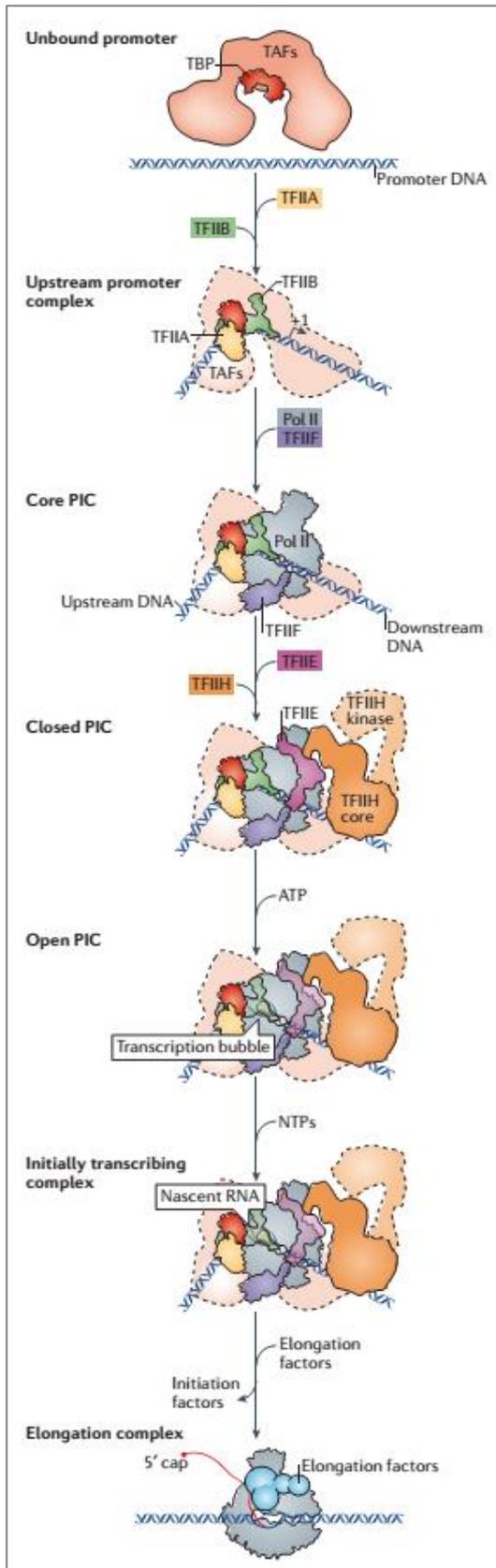


Figure V.2 : Etapes de l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II. Le complexe de pré-initiation (CPI) résulte de l'assemblage des facteurs généraux de la transcription (de couleurs variées) et de l'ARN polymérase II (de couleur grise) sur le promoteur ADN. Le nom des complexes intermédiaires formés au cours de la transition initiation – élongation sont indiqués sur la gauche du schéma. La sous-unité TBP du facteur TFIID se lie au promoteur, ce qui induit une flexion de l'ADN. Le complexe TBP – ADN est ensuite stabilisé par les facteurs TFIIB et TFIIF. A ce pré-complexe vient s'ajouter le couple ARN Pol II – TFIIF, le tout formant le cœur du CPI. Enfin la liaison de TFIIE et TFIIH complète le CPI, d'abord dans une configuration fermée (closed PIC). En présence d'ATP, l'ADN s'ouvre (open PIC, transcription bubble) et la synthèse de l'ARNm commence. Finalement, la dissociation des différents facteurs de l'initiation permet l'élongation par la Pol II, associée à des facteurs d'élongation de la transcription (couleur bleue). NTP : Nucleoside triphosphate ; TAF : TBP-associated factor ; PIC : Pre-initiation complex (D'après Sainsbury et al., 2015).

3. Régulation de l'élongation

Le passage de l'initiation à l'élongation implique la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II, et un échange des co-facteurs associés avec l'ARN Pol II. Dès que l'ARN Pol II est recrutée, et que la formation du CPI est achevée, l'enzyme transcrit généralement une courte séquence d'ARN, de 30 à 60 pb, puis se met en « pause ». On parle alors de « promoter proximal pausing » de l'ARN Pol II. Plusieurs scénarios sont alors envisageables : l'ARN Pol II reste associée au promoteur ou s'en échappe, la fonction enzymatique est activée ou inhibée. Les unes ou les autres de ces voies sont régulées par un équilibre subtil entre des facteurs de régulation positifs et négatifs (Lee and Young, 2000, 2013).

Deux facteurs de régulation négatifs, DSIF (DRB Sensitivity-Inducing Factor) et NELF (Negative transcription Elongation Factor), sont physiquement associés aux molécules d'ARN Pol II en pause. DSIF et NELF sont sensibles aux inhibiteurs de la transcription tels que le DRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-benzimidazole) qui inhibent la synthèse de l'ARNm et la phosphorylation du CTD (Dubois et al., 1994). Les polymérase en pause peuvent alors soit reprendre l'élongation, grâce à une levée d'inhibition du statut « pause », soit finir la transcription et libérer de petits fragments ARN (Lee and Young, 2013). La levée de l'inhibition et la reprise de l'élongation nécessitent le recrutement et l'activation du facteur P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b). Le module CDK9 (Cyclin-Dependent Kinase 9) de P-TEFb phosphoryle la sérine 2 du CTD de la Pol II, ainsi que les facteurs de régulation négatifs qui lui sont associés (DSIF et NELF). L'ensemble de ces phosphorylations permet la dissociation des régulateurs négatifs, et la reprise de l'élongation. P-TEFb est recruté sous la forme d'un plus large complexe, le complexe de super-élongation, dont la composition ne sera pas détaillée ici (Luo et al., 2012). Des facteurs de transcription tels que c-Myc stimulent aussi l'activité de P-TEFb, contribuant ainsi au contrôle de l'élongation de la transcription (Rahl et al., 2010).

II. Le Médiateur de la transcription

1. Composition et structure

a. Structure globale du Médiateur

Le Médiateur de la transcription fut découvert chez la levure dans les années 90 (Flanagan et al., 1991; Thompson et al., 1993). Son existence fut ensuite démontrée chez les mammifères et les plantes: une structure commune de 17 sous-unités conservée chez ces organismes a suggéré une origine commune (Bourbon, 2008). Le Médiateur est donc conservé chez tous les eucaryotes, des organismes unicellulaires aux métazoaires.

Le Médiateur est un complexe composé de 25 sous-unités chez la levure, et d'une trentaine de sous-unités chez l'homme (30 sous-unités, auxquelles s'ajoutent 3 sous-unités

paralogues) (Figure V.3). Le complexe est divisé en quatre modules distincts : la tête, le module central, la queue et le module CDK (Figure V.3). Le module CDK, composé des sous-unités MED12, MED13, Cyclin C (CyC) et CDK8, n'est que transitoirement associé avec le reste du Médiateur. Chez les mammifères, certaines sous-unités du module CDK possèdent des paralogues : MED13L, MED12L et CDK19 sont les paralogues respectifs de MED13, MED12 et CDK8. Nous verrons par la suite que le module CDK possède des caractéristiques qui le distinguent fonctionnellement des autres modules du Médiateur.

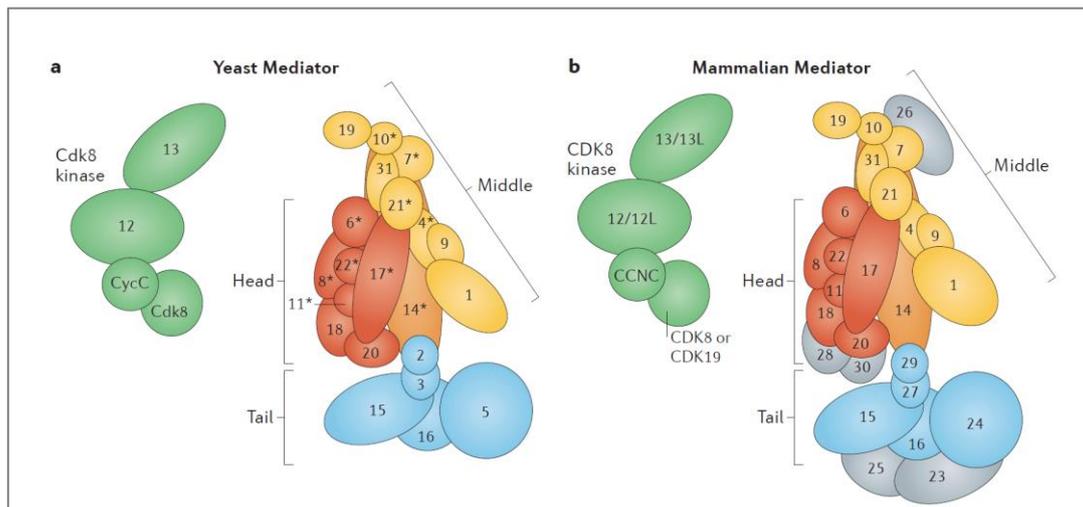


Figure V.3 : Composition du complexe du Médiateur de la transcription. Représentation de l'organisation des différents modules du Médiateur chez la levure (a) et les mammifères (b). Le complexe est organisé en quatre modules qui possèdent des fonctions distinctes : la tête, le module central, la queue et le module kinase CDK (CDK8 sur les schémas). Chez les mammifères, certaines sous-unités du module CDK possèdent des paralogues : MED13L, MED12L et CDK19 sont les paralogues respectifs de MED13, MED12 et CDK8 (D'après Soutourina, 2018).

Il a initialement été proposé que le module de la tête, le module central et le module de la queue formeraient le corps du Médiateur. Cependant, des études structurales et biochimiques récentes ont permis de mieux caractériser l'architecture du Médiateur, révélant un corps du Médiateur composé de la tête et du milieu, tandis que les modules queue et CDK auraient des fonctions régulatrices (Cevhler et al., 2014; Plaschka et al., 2015; Jeronimo et al., 2016). La plupart des études structurales du Médiateur ont été effectuées chez la levure. La structure du Médiateur chez les mammifères est donc moins détaillée, même si l'on sait que cette architecture est bien conservée entre la levure et l'homme (Figure V.4) (Cevhler et al., 2014). Des études de modélisation 3D chez la levure ont également montré un rôle particulier de la sous-unité MED14, qui établit des contacts étroits avec les trois principaux modules du Médiateur (tête, milieu et queue) (Robinson et al., 2015). La place centrale de cette sous-unité a également été mise en évidence chez l'homme, révélant un rôle structural et fonctionnel au sein du Médiateur (Figure V.3) (Cevhler et al., 2014).

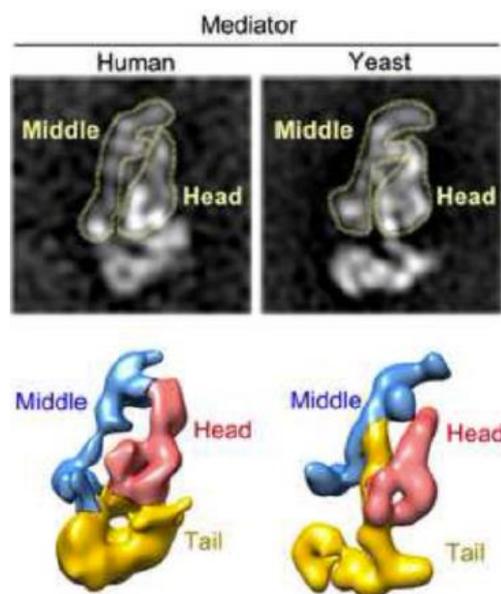


Figure V.4 : Structure et organisation du Médiateur chez l'homme et la levure. Les complexes du Médiateur chez l'homme et la levure ont été analysés par microscopie électronique. Cette étude a mis en évidence une conservation de la structure globale et des interactions entre les modules tête, milieu et queue chez l'homme et la levure (D'après Tsai et al., 2014).

b. Le module CDK8

Les quatre sous-unités MED12, MED13, CyC et CDK8 forment un module CDK stable, qui peut transitoirement s'associer avec les trois autres modules du Médiateur. Cette association réversible permet une régulation fonctionnelle et structurelle qui sera détaillée dans le paragraphe suivant. Les sous-unités MED12 et CyC sont essentielles à l'activité kinase de CDK8 (Knuesel et al., 2009b), tandis que la sous-unité MED13 servirait de lien direct entre le module CDK et le reste du Médiateur (Knuesel et al., 2009a; Tsai et al., 2013).

Parmi ces quatre sous-unités, trois d'entre-elles possèdent des protéines paralogues. Les sous-unités MED12L, MED13L et CDK19 sont respectivement les paralogues de MED12, MED13 et CDK8. Les rôles biologiques de ces sous-unités paralogues sont encore aujourd'hui mal connus. Il semble cependant que ces sous-unités soient mutuellement exclusives : MED12 et MED12L ne peuvent coexister dans un même complexe du Médiateur, de même pour les sous-unités MED13 et MED13L, ou CDK8 et CDK19 (Daniels et al., 2013). Les sous-unités paralogues ont été associées à des désordres neuronaux et du développement (Muncke et al., 2003; Mukhopadhyay et al., 2010; Adegbola et al., 2015). Cependant, leur rôle relatif à MED12, MED13 et CDK8 n'est pour l'instant pas défini.

c. Le Médiateur : une structure dynamique

La variabilité de la composition du Médiateur fait de ce complexe un acteur unique au cours de la transcription. En effet des sous-unités peuvent être ajoutées ou soustraites au complexe, ce qui affecte sa fonction biologique. L'exemple le mieux caractérisé de ce type

d'échange au sein du Médiateur est l'association réversible du module CDK avec les autres modules. Cette association réversible permet de distinguer deux formes du Médiateur : le Médiateur (tête, milieu et queue) associé à l'ARN Pol II, et le Médiateur associé au module CDK (Taatjes et al., 2002). L'association Médiateur – ARN Pol II empêche l'association du module CDK, et inversement la forme Médiateur – CDK ne peut s'associer avec l'ARN Pol II. D'autre part, la sous-unité MED26 (qui appartiendrait au module du milieu) chez les mammifères n'est pas présente dans la forme Médiateur – CDK. L'association du module CDK entraîne de profonds changements de structure et de fonction du Médiateur (Knuesel et al., 2009b; Tsai et al., 2013). Les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas entièrement connus, mais des études récentes ont mis en évidence des MPT (phosphorylation et ubiquitination) et un renouvellement des sous-unités MED13/MED13L (Davis et al., 2013). Ces sous-unités servant de liaison entre le module CDK et le Médiateur, leur dégradation peut donc directement affecter l'association du module CDK.

Grâce à la microscopie électronique, la localisation et l'organisation des différents modules du Médiateur ont pu être redéfinies ces dernières années, et la délimitation des modules est aujourd'hui mieux connue (Tsai et al., 2014). Cependant, bien que chez la levure l'organisation des différents modules soit bien caractérisée, la localisation de certaines sous-unités reste à définir chez les mammifères. En effet, même si des sous-unités telles que MED23, MED25, MED26, MED28 et MED30 ont été assignées à un module en particulier, leur localisation reste encore débattue (Figure V.3) (Soutourina, 2018).

2. Fonctions du Médiateur

a. Le Médiateur et la transcription

Comparé aux autres acteurs de la transcription, le Médiateur est unique de par sa taille (1,2 MDa) et le nombre de sous-unités le composant (Taatjes, 2010). Afin de réguler la transcription, le Médiateur est recruté sur les sites enhancers chez les métazoaires (autrement appelés « Upstream Activating Sequences » chez la levure) (Figure V.5a). Ce recrutement passe par des interactions directes avec les FST. En effet, le Médiateur interagit avec des centaines de FST participant ainsi à la transmission de signaux de régulation entre les différents acteurs de la transcription (Poss et al., 2013). Les interactions Médiateur – FST impliquent le plus souvent le module de la queue (Malik and Roeder, 2010). Enfin le Médiateur établit des contacts avec les composants du CPI au niveau des sites promoteurs, qui peuvent être situés à très grande distance des régions enhancers.

i. Médiateur et assemblage du complexe de pré-initiation

La principale fonction du Médiateur au cours de la transcription est la stimulation et la formation du CPI (Figure V.5b) via la coopération avec différents composants. Par exemple, le Médiateur permet de recruter l'ARN Pol II (Näär et al., 2002). Le Médiateur peut également directement interagir avec plusieurs composants du CPI. De nombreuses études ont montré des

fonctions coopératives, voir synergiques, entre le Médiateur et TFIID au cours de l'assemblage du CPI et de l'activation de la transcription. De plus, le Médiateur aide à réguler le recrutement et/ou l'activité des facteurs TFIIA, TFIIB, TFIIE et TFIIIF. Le recrutement de TFIIH est également facilité grâce à son interaction avec la sous-unité MED11 de la tête du Médiateur (Esnault et al., 2008). Toutes ces études concordent à démontrer le rôle crucial du Médiateur dans les étapes précoces de la transcription.

ii. Médiateur et initiation de la transcription par l'ARN Pol II

Dès l'assemblage du CPI et son positionnement en conformation « ouverte » (voir le paragraphe « Formation du complexe de pré-initiation »), l'ARN Pol II se dissocie du Médiateur et des composants du CPI afin de quitter le promoteur et initier ainsi la phase d'élongation (Figure V.5c). Comme nous l'avons vu précédemment, la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II par TFIIH est un évènement crucial pour une transition efficace entre initiation et élongation. Cette phosphorylation est également nécessaire pour perturber les interactions ARN Pol II – Médiateur (Svejstrup et al., 1997). La capacité de TFIIH à phosphoryler le CTD est en outre dépendante du Médiateur. En effet, en absence de Médiateur, l'ARN Pol II est recrutée mais aucune des serine 5 et 7 du CTD ne sont phosphorylées. A l'inverse, la phosphorylation est efficacement rétablie lorsque le Médiateur est réintroduit (Boeing et al., 2010). Un facteur encore non défini actuellement concerne le nombre de séquences répétées du CTD qui doivent être phosphorylées pour permettre à l'ARN Pol II de s'échapper du promoteur.

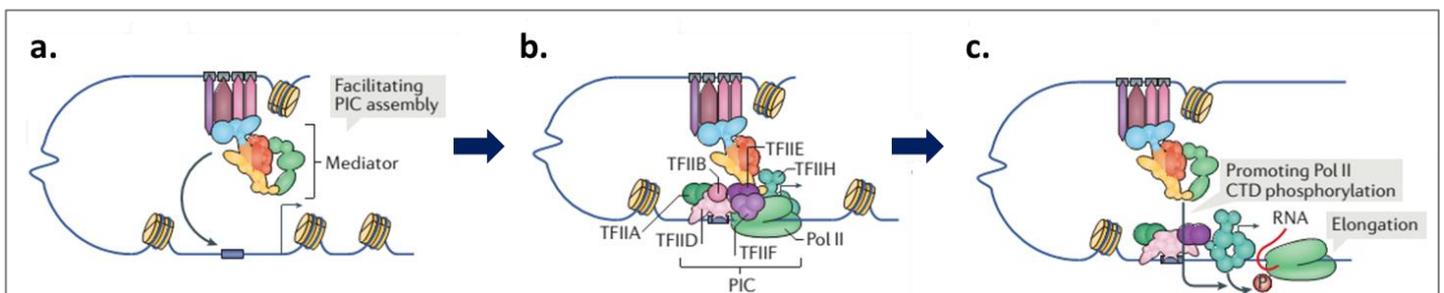


Figure V.5 : Fonctions du Médiateur dans les premières étapes de la transcription. a. Le Médiateur est recruté sur les séquences enhancers grâce à son interaction avec les FST. b. Le Médiateur participe ensuite à la formation du CPI en interagissant directement avec plusieurs FGT permettant ainsi le recrutement de l'ARN Pol II. c. La phosphorylation du CTD par TFIIH est également favorisée par le Médiateur, ce qui permet à l'ARN Pol II de quitter le promoteur et d'initier l'élongation. PIC : Pre-Initiation Complex (Adapté d'après Soutourina, 2018).

iii. Médiateur et élongation de la transcription par l'ARN Pol II

Chez les métazoaires, l'ARN Pol II peut s'arrêter après avoir transcrit entre 30 à 60 nucléotides. L'arrêt ou la reprise de l'élongation par l'ARN Pol II dépend de plusieurs complexes. Certains interagissent avec le Médiateur, tel que le complexe de super élongation (SE) qui régule l'élongation via plusieurs facteurs, dont P-TEFb (Adelman and Lis, 2012) et

MED26 (Takahashi et al., 2011). La région de MED26 qui se lie au complexe SE peut également se lier à TFIID. Ces données suggèrent un rôle particulier de MED26, qui pourrait participer à la formation du CPI dans un premier temps (via sa liaison avec TFIID), et réguler l'élongation dans un second temps (via son interaction avec le complexe SE) (Takahashi et al., 2011).

Certaines sous-unités du complexe SE (dont la sous-unité CDK9 du facteur P-TEFb) peuvent également se lier au complexe Médiateur – CDK (Ebmeier and Taatjes, 2010), qui en interagissant avec P-TEFb, permet son recrutement aux sites promoteurs (Donner et al., 2010). Comme l'association du module CDK avec le Médiateur est mutuellement exclusive avec l'ARN Pol II, la régulation de l'élongation par la forme Médiateur – CDK ne peut probablement avoir lieu que lorsque l'interaction ARN Pol II – Médiateur est détruite.

La sous-unité MED26 et le module CDK ne sont que rarement présents dans un même complexe du Médiateur (Ebmeier and Taatjes, 2010). Il est alors envisagé que ces deux acteurs régulent l'activité et la localisation du complexe SE au sein du génome.

iv. Le rôle particulier du module CDK

L'étude de la régulation de la transcription par le module CDK est un champ de recherche très intense, générant un grand nombre de connaissances faisant néanmoins débat. En effet, il est admis que le module CDK est en partie associé à une répression de l'expression des gènes. Deux modèles majeurs s'opposent pour expliquer ce mécanisme d'inhibition par le module CDK : une inhibition enzymatique ou une inhibition physique.

La sous-unité CDK8 est une kinase capable de phosphoryler de multiples substrats, dont plusieurs FGT, l'ARN Pol II, des sous-unités du Médiateur, telles que MED14, MED26, MED12 ou MED13, ou encore la cycline H qui appartient à TFIID (Knuesel et al., 2009b; Poss et al., 2016). Le premier modèle propose donc une répression de la transcription qui nécessite cette activité kinase. Par exemple, CDK8 peut phosphoryler le CTD de l'ARN Pol II, ce qui perturbe l'interaction entre le Médiateur et l'ARN Pol II (Hengartner et al., 1998). De plus, CDK8 peut phosphoryler la cycline H, ce qui inhibe TFIID et empêche l'initiation de la transcription (Akoulitchev et al., 2000).

Dans le second modèle, l'association du module CDK avec le reste du Médiateur entraînerait un changement de conformation de ce dernier, altérant les étapes d'initiation. L'association du module CDK avec le Médiateur serait alors suffisante pour bloquer l'interaction entre le Médiateur et l'ARN Pol II (Näär et al., 2002; Elmlund et al., 2006). Il a récemment été montré par microscopie électronique que l'interaction du module CDK avec le module du milieu du Médiateur peut interférer avec le site de liaison du CTD de l'ARN Pol II sur le Médiateur. Des interactions compétitives entre le module CDK et le CTD seraient ainsi à l'origine de la répression induite par le module CDK (Tsai et al., 2013). Dans ce modèle, l'effet du module CDK est totalement indépendant de l'activité kinase de la sous-unité CDK8 (Knuesel et al., 2009a).

Dans les deux modèles présentés ci-dessus, la fonction principale du module CDK reste une régulation négative de l'initiation ou de la ré-initiation de la transcription. Cependant,

d'autres études indiquent que CDK8 pourrait également positivement réguler la transcription de façon directe ou indirecte. Par exemple, en phosphorylant directement la sérine 10 de l'histone H3, ce qui stimule l'acétylation H3K14 par GCN5 (Meyer et al., 2008), ou en facilitant l'élongation par l'ARN Pol II (Donner et al., 2010; Galbraith et al., 2013). Ces résultats suggèrent de multiples rôles du module CDK sur la transcription, spécifiques du contexte. Le nombre élevé de substrats connus de CDK8, suggérant une multitude de MPT potentielles, pourrait notamment expliquer les différentes fonctions de ce petit module.

b. Autres fonctions du Médiateur

i. Médiateur et architecture de la chromatine

L'organisation 3D du génome est cruciale pour coordonner efficacement l'expression des gènes. La formation de boucles d'ADN permet l'interaction de séquences d'ADN non contiguës, et représente un mécanisme majeur de régulation chez les métazoaires. Bien que le Médiateur ne soit pas nécessaire à la formation des boucles, il intervient néanmoins dans leur stabilisation. Chez les mammifères, la formation de telles structures est corrélée à des niveaux importants de transcription. Les boucles rapprochant les enhancers des promoteurs seraient également spécifiques d'un type cellulaire donné (Sanyal et al., 2012).

Les ARN non-codants (ncARN) sont des régulateurs clés des profils d'expression des gènes au cours du développement. Les ncARN sont particulièrement actifs dans les processus épigénétiques pendant lesquels ils sont généralement associés à une répression des gènes. Cependant, plusieurs études récentes ont mis en évidence des fonctions de certains ncARN qui se rapprochent des fonctions connues du Médiateur, telle que leur capacité à se lier aux séquences enhancers. Une sous-catégorie de ncARN, identifiée comme ncARN activateurs (aARN), fonctionne en activant la transcription de ses gènes voisins (Ørom et al., 2010). Ces aARN interagissent avec le Médiateur, potentiellement via la sous-unité MED12. Cette interaction est corrélée à une activation de la transcription et à la formation de boucles entre le site de liaison des aARN et les promoteurs cibles (Figure V.6) (Lai et al., 2013). MED12 appartenant au module CDK, l'interaction observée entre MED12 et les aARN pourrait permettre de garder le module CDK à proximité du promoteur, pendant que l'ARN Pol II est associée au reste du Médiateur. Cette interaction pourrait donc faciliter l'association réversible de la forme Médiateur – CDK lorsque cela est nécessaire (Lai et al., 2013).

La formation de boucles chez les mammifères pourrait également être stabilisée par des interactions entre le Médiateur et le CTD de l'ARN Pol II qui interagissent chez la levure et chez l'homme (Näär et al., 2002; Thompson et al., 1993). Cependant le nombre de répétitions du CTD est fortement augmenté entre la levure (26 répétitions) et l'homme (52 répétitions). Cette augmentation de taille du CTD est corrélée à l'augmentation de la distance possible entre un enhancer et son promoteur cible. Un CTD plus long serait également nécessaire à la viabilité des cellules mammifères (Thompson et al., 1993). Une extension du CTD permettrait donc d'établir des boucles de longue distance. Il a par exemple été montré qu'un CTD tronqué

diminue fortement la transcription qui nécessite des séquences enhancers à distance du promoteur, tandis que la transcription qui passe directement par des éléments proches du promoteur n'est pas affectée (Gerber et al., 1995).

La stabilisation des boucles passerait enfin par l'action des cohésines. Nous avons vu dans le chapitre IV que les cohésines possèdent de multiples rôles, dont la régulation topologique du génome. Dans les cellules de mammifères, le Médiateur interagit avec le complexe des cohésines, ce qui contribuerait à la formation des boucles enhancer – promoteur (Figure V.6) (Kagey et al., 2010). Les boucles d'ADN sont donc des événements régulés par de multiples acteurs chez les mammifères, qui agissent de concert pour faciliter l'expression des gènes.

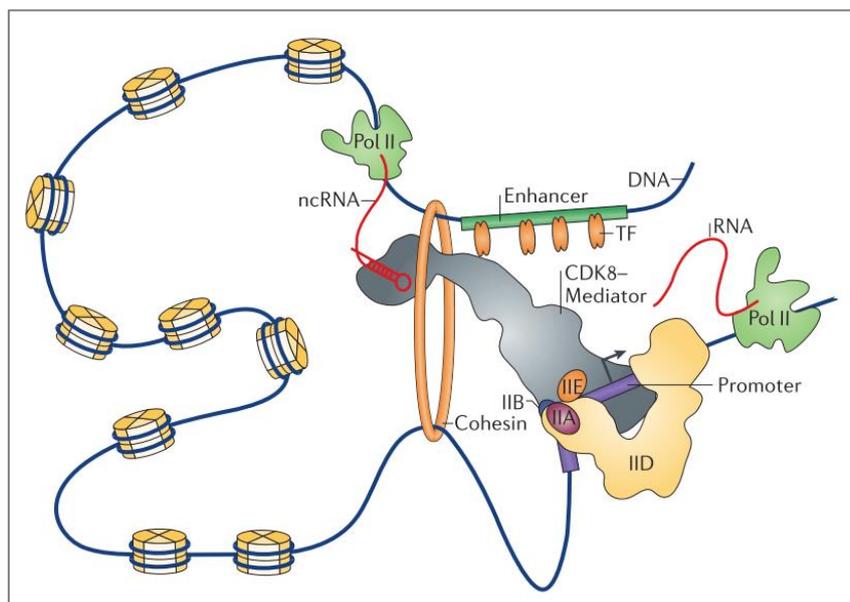


Figure V.6 : Rôle du Médiateur dans l'architecture de la chromatine. Les interactions entre le Médiateur, les facteurs généraux de la transcription, les cohésines et les ARN non-codants pourraient stabiliser les boucles d'ADN qui rapprochent les enhancers des sites promoteurs. ncRNA : non-coding RNA ; TF : Transcription Factor (D'après Allen and Taatjes, 2015).

ii. Médiateur et réparation

Le rôle du Médiateur en dehors de la transcription est pour l'instant peu documenté. Cependant, un nouveau lien entre le Médiateur et la réparation de l'ADN a récemment été mis en évidence chez la levure (Eyboulet et al., 2013). Le point de départ de cette étude est l'observation par double hybride d'une interaction entre MED17, une sous-unité du module de la tête du Médiateur, et la protéine de réparation Rad2. Rad2 (XPG chez l'homme) est impliquée dans la réparation des lésions UV par la voie du NER. Une analyse à l'échelle du génome a montré la présence de Rad2 sur des gènes transcrits par la Pol II, également occupés par le Médiateur. De plus, des mutants de MED17 deviennent sensibles aux UV, ce qui est corrélé avec une perte de Rad2 sur les gènes transcrits par la Pol II, ainsi qu'une perte d'interaction

entre la protéine Rad2 et MED17 (Eyboulet et al., 2013). Les auteurs proposent alors une nouvelle fonction du Médiateur, qui faciliterait le recrutement de Rad2 au niveau des gènes transcrits, favorisant ainsi une réparation rapide des lésions induites par UV (Figure V.7).

Une seconde étude, dans les cellules humaines, a confirmé le lien entre la sous-unité MED17 et la réparation des dommages par la voie du NER. Dans cette étude, le traitement des cellules par UVC induit une relocalisation de MED17 du cytoplasme vers le noyau, ainsi qu'une colocalisation nucléaire de MED17 et de la protéine XPB. Les auteurs ont également mis en évidence une interaction entre la sous-unité MED17, et les protéines de réparation XPG et XPB (Kikuchi et al., 2015).

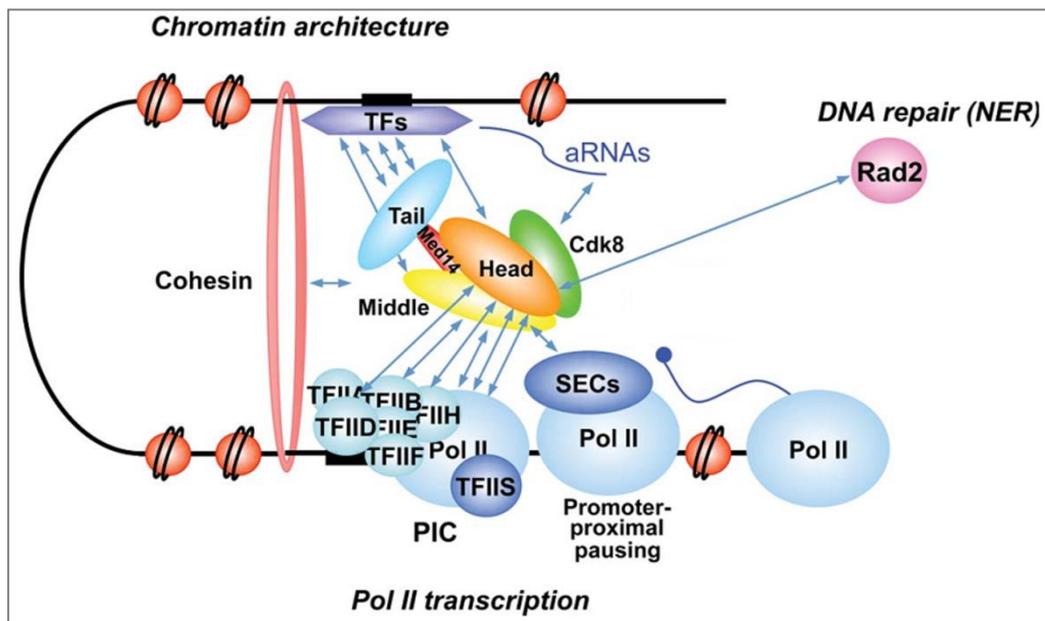


Figure V.7 : Principales fonctions du Médiateur. Le Médiateur est impliqué dans la formation du CPI, l'élongation de la transcription, l'architecture de la chromatine et la réparation de l'ADN. SEC : Super Elongation Complex ; CPI : Complexe de Pré-initiation ; TF : Transcription Factor (Adapté d'après Eychenne et al., 2017).

3. Le Médiateur et les voies de signalisation

Les FST sont activés en réponse à différentes voies de signalisation. Chaque voie de signalisation active un FST spécifique, qui cible à son tour un module (ou une sous-unité) spécifique du Médiateur. Le Médiateur permet alors de transférer les signaux des FST à la machinerie de transcription, ce qui entraîne l'activation ou la répression d'un ensemble de gènes. Etant donné le nombre important de sous-unités composant le Médiateur, ce complexe est un acteur clé de multiples voies de signalisation. Afin d'illustrer ce processus, quelques exemples bien documentés sont présentés dans ce chapitre. Le module CDK ayant une place importante dans notre étude, j'ai choisi de développer des exemples impliquant particulièrement les sous-unités du module CDK. Les sous-unités des autres modules sont également la cible de nombreux FST et interviennent dans plusieurs voies de signalisation. Cependant leurs rôles ne seront pas détaillés ici.

La voie de signalisation WNT- β caténine est cruciale pour le développement de nombreux tissus, et une altération de cette voie est impliquée dans de multiples cancers (Kahn, 2014). Des études génétiques chez les métazoaires ont montré que l'activation de cette voie nécessite les sous-unités MED12 et MED13, et qu'il existe une interaction directe entre MED12 et la β caténine (Kim et al., 2006). Le FST E2F1 réprime la voie WNT - β caténine, en favorisant la dégradation de la β caténine. Or la phosphorylation de E2F1 par le module CDK empêche cette fonction de E2F1, et par conséquent la répression de la voie de signalisation (Morris et al., 2008).

Les protéines de la famille des facteurs TGF β (Transforming Growth Factor β) ont des rôles essentiels dans le développement et la tumorigenèse. Les molécules TGF β activent une autre famille de FST, les facteurs SMAD1-5, qui peuvent s'associer de différentes manières (par exemple SMAD1/5-4 ou SMAD2/3) (Gaarenstroom and Hill, 2014). Il a été montré que la sous-unité MED15 est essentielle à la transduction du signal par les complexes SMAD2/3 et SMAD3/4, et se lie aux complexes en réponse au TGF β (Kato et al., 2002). La sous-unité MED12 régule également cette voie de signalisation en se liant directement au TGF β 2, ce qui inhibe son activité (Huang et al., 2012).

Les sous-unités du module CDK participent donc à la régulation de plusieurs voies de signalisation majeures. Les quatre sous-unités du module, bien que souvent associées à un unique module avec un fonctionnement commun, possèdent cependant des rôles distincts, parfois opposés. Par exemple, la sous-unité MED12 peut inhiber le TGF β (Huang et al., 2012), tandis que CDK8 peut directement phosphoryler les facteurs SMAD1 ou SMAD2/3, permettant ainsi leur activation (Alarcon et al, 2009). Ceci signifie que chaque sous-unité du module pourrait avoir des rôles propres, qui ne nécessitent pas forcément la présence des quatre sous-unités. De plus, trois de ces quatre sous-unités possèdent des paralogues, avec une association mutuellement exclusive. Un même complexe peut donc contenir un mélange de sous-unités paralogues et non paralogues. Tout ceci suggère une organisation et un fonctionnement probablement plus complexe de ce module qu'initialement prévu.

III. Pathologies humaines liées au Médiateur

Des mutations ou des modifications de l'expression des sous-unités du Médiateur sont associées à de nombreuses pathologies. La grande diversité de phénotypes retrouvés s'explique par le nombre élevé de protéines qui composent ce complexe, et par son rôle essentiel dans l'expression des gènes. Le Médiateur est impliqué dans plusieurs types de cancers, ainsi que dans divers types de troubles du développement (Spaeth et al., 2011).

Un des facteurs à l'origine du développement de cancers est une perturbation de l'expression des gènes. Des modifications du complexe Médiateur sont donc naturellement retrouvées dans différents types de cancers. Par exemple, le gène MED12 est fréquemment muté (70% des tumeurs) chez les patientes atteintes d'une forme de sarcome de l'utérus (léiomyosarcome utérin) (Mäkinen et al., 2011). Des mutations de MED12 sont également

retrouvées dans le cancer de la prostate (Barbieri et al., 2012). Le gène codant CDK8 a été identifié comme un oncogène, favorisant l'expression des gènes contrôlés par la voie de la β caténine, et la transformation tumorale dépendante de la β caténine (Firestein et al., 2008; Morris et al., 2008). Le rôle de cet oncogène a été mis en évidence dans le cancer colorectal (Firestein et al., 2008) ainsi que dans le mélanome (Kapoor et al., 2010). Une étude récente a également montré un rôle de l'activité kinase de CDK8 dans la leucémie myéloïde aigüe (Pelish et al., 2015). Cette même étude a caractérisé un nouvel inhibiteur spécifique de CDK8 (et de son paralogue CDK19), la Cortistatine A, capable de favoriser l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (Pelish et al., 2015). D'autres sous-unités pourraient également servir de cibles thérapeutiques pour les traitements anti-cancéreux. Par exemple, MED1 et MED17 sont surexprimés dans 50% des cancers de la prostate. Une perte de MED1 ou de MED17 dans les cellules cancéreuses diminue la prolifération cellulaire, inhibe la progression du cycle cellulaire, et augmente l'apoptose des cellules cancéreuses (Vijayvargia et al., 2007). Toutes ces études attestent du rôle central du Médiateur dans le développement tumoral, et placent le Médiateur comme une cible de choix des thérapies anti-tumorales.

Des mutations des sous-unités du Médiateur ont également été associées à une variété de troubles du développement. Par exemple, des mutations de la sous-unité MED12 sont retrouvées dans le syndrome du retard mental lié au chromosome X (Risheg et al., 2007; Zhou et al., 2012). MED12 est de plus nécessaire à la fermeture du tube neural, et des mutations de cette sous-unité entraînent notamment une exencéphalie et un *spina bifida* chez les embryons de souris (Rocha et al., 2010). Une mutation de la sous-unité MED17 est également associée à une atrophie cérébrale infantile (Kaufmann et al., 2010).

Les sous-unités du Médiateur sont donc des cibles thérapeutiques potentielles dans de nombreuses pathologies. Cependant le Médiateur est également un acteur essentiel dans l'expression des gènes, et le choix des sous-unités ciblées doit donc prendre en compte les fonctions biologiques du Médiateur, qui ne doivent pas être altérées. La conception de nouvelles thérapies devra donc probablement être finement contrôlée, et les choix thérapeutiques devront s'articuler autour d'une balance entre le bénéfice apporté et les risques encourus.

IV. Conclusion générale du chapitre V

Le Médiateur de la transcription est un co-activateur qui présente de multiples fonctions. Initialement connu pour sa régulation de la transcription, on sait maintenant que ce complexe participe, avec les complexes de cohésines, à la formation de boucles de chromatine, ayant donc un rôle important dans l'organisation tridimensionnelle du génome. Un lien entre le Médiateur et la réparation de l'ADN par la voie du NER a également été mis en évidence chez la levure (Eyboulet et al., 2013) et l'homme (Kikuchi et al., 2015), suggérant des fonctions plus étendues que celles identifiées à ce jour. Notre projet de recherche nous a mené à étudier le rôle du Médiateur et des cohésines dans une autre voie de réparation, le BER, et a permis d'apporter de nouvelles preuves d'un rôle collaboratif du Médiateur et des cohésines dans les processus essentiels de la cellule tels que la réparation de l'ADN.

Objectifs

Les dommages à l'ADN tels que les bases modifiées ou les sites abasiques sont pris en charge dans la cellule par la voie de réparation par excision de base (BER). La persistance de ces lésions peut bloquer des processus cellulaires essentiels, tels que la transcription ou la réplication, et mener *in fine* à la mort de la cellule. Les bases modifiées peuvent également être mutagènes, comme c'est le cas de la lésion 8-oxoguanine (8-oxoG), la principale forme oxydée de la guanine. La reconnaissance et l'excision de cette lésion est initiée par une enzyme spécifique de son substrat, l'ADN glycosylase OGG1.

Des études antérieures ont permis de mettre en évidence le recrutement d'OGG1 à la chromatine en réponse à un stress oxydatif, ainsi que la cinétique de réparation de la 8-oxoG associée (Amouroux et al., 2010). De plus, il a été montré qu'une forme mutante d'OGG1 (F319A), qui ne reconnaît plus son substrat et perdant ainsi son activité glycosylase, est toujours capable d'être recrutée sur la chromatine après le stress oxydatif (Amouroux et al., 2010). Ces résultats suggèrent l'existence d'autres signaux permettant de déclencher le recrutement d'OGG1 sur la fraction chromatiniennne. Afin d'identifier les protéines potentiellement impliquées dans le recrutement d'OGG1, un crible à haut débit a été réalisé dans des cellules humaines Hela surexprimant la forme OGG1-GFP. Parmi les candidats issus de ce crible, deux catégories de protéines ont été sélectionnées : des sous-unités des complexes du Médiateur de la transcription et des cohésines.

L'objectif de ce projet de recherche est donc d'étudier le rôle des complexes cohésines et Médiateur dans la réparation de la 8-oxoG par le BER, et plus particulièrement par OGG1. Nous avons cherché à savoir : 1) Quelles sous-unités de ces deux complexes sont essentielles au recrutement d'OGG1 et quelle est la dynamique de ces différents acteurs en fonction d'un stress oxydatif ?, 2) Quel est l'impact de ces complexes sur la réparation de la 8-oxoG, 3) Ces complexes ont-ils un rôle dépendant du cycle cellulaire ?, 4) Peut-on généraliser les effets observés à d'autres types de stress ou d'autres protéines du BER ?, 5) D'autres facteurs peuvent-ils participer au mécanisme de recrutement d'OGG1 ?

Pour conduire ce projet, plusieurs techniques complémentaires ont été utilisées. Des études de microscopie confocale et de biochimie nous ont permis de suivre la relocalisation d'OGG1 et de caractériser la dynamique de différentes protéines. La microscopie confocale nous a également permis de localiser ces différentes protéines au sein du noyau, avec ou sans stress oxydatif. Enfin nous avons pu étudier l'association et la proximité de ces protéines par des techniques de co-immunoprécipitation et de FLIM-FRET.

RESULTATS

I. Historique du projet de recherche

Au cours des dernières années, notre laboratoire a cherché à comprendre comment les enzymes du BER sont capables de trouver leurs substrats au sein du contexte de la chromatine. Il a été montré qu'un traitement par KBrO_3 , produisant une grande quantité de lésions 8-oxoG dans l'ADN (Ballmaier and Epe, 2006), entraîne le recrutement d'OGG1 ainsi que d'autres enzymes du BER (XRCC1, APE1, Ligase III) dans les domaines d'euchromatine du noyau, riches en ARNm et en ARN Pol II, ce recrutement étant donc complètement exclu de l'hétérochromatine. De plus, la compaction de la chromatine par un stress osmotique (sucrose) mène à une inhibition complète mais réversible de la réparation de la 8-oxoG (Amouroux et al., 2010). Ces résultats suggèrent un recrutement d'OGG1, et donc de la machinerie de réparation, dans des régions de chromatine où l'ADN est facilement accessible. En outre, une forme mutante d'OGG1 (F319A) ayant perdu l'affinité pour son substrat, la 8-oxoG, est tout de même capable d'être recrutée sur la fraction chromatinienne après traitement par KBrO_3 . Ce dernier résultat nous indique un recrutement d'OGG1 sur la chromatine indépendant d'une interaction directe avec la base oxydée. La question suivante s'est alors posée : quels sont les signaux capables de déclencher la relocalisation d'OGG1 de la fraction soluble du noyau (nucléoplasme) vers les domaines d'euchromatine après un stress oxydatif ? Pour répondre à cette question, un crible à haut débit a été réalisé. Ce crible est décrit dans le paragraphe suivant. L'ensemble du crible ainsi que la validation des candidats ont été effectués avant mon arrivée sur ce projet de recherche (Figures 1 et 2).

II. Quelles protéines influencent le recrutement d'OGG1 ?

Afin d'identifier les protéines nécessaires au recrutement chromatinien d'OGG1 en réponse à un stress oxydatif, un crible siRNA à haut débit a été réalisé en collaboration avec la plateforme PARI du CEA de Saclay. Ce crible avait pour principe de cibler 7000 gènes (3 siRNAs par gène) appartenant à une base de données Qiagen druggable. Trois jours après la transfection des siRNAs dans des cellules Hela exprimant de façon stable OGG1-GFP, les cellules ont été traitées par un stress oxydatif, le bromate de potassium (KBrO_3), à la dose de 40 mM pendant 45 min. Le traitement a ensuite été remplacé par du milieu complet pendant 3h. Ce temps caractéristique de 3h post-traitement a été choisi suite aux études publiées précédemment par notre laboratoire (Amouroux et al., 2010) : nous savons qu'OGG1 est majoritairement recrutée sur la chromatine entre 2h et 4h post-traitement dans des cellules surexprimant OGG1 (OGG1-GFP), suite à un stress oxydatif par KBrO_3 dans les conditions décrites ci-dessus. Trois heures après la fin du traitement les cellules ont été lavées par un tampon CSK. Le CSK contient un détergent permettant d'éliminer la fraction soluble des cellules, ce qui nous permet de visualiser la fraction insoluble des noyaux, et donc la fraction chromatinienne. Les noyaux ont enfin été marqués au DAPI. L'intensité de fluorescence de la protéine OGG1-GFP a été analysée pour chaque siRNA, ce qui a permis d'identifier des gènes candidats qui soit inhibaient soit facilitaient le recrutement de l'ADN glycosylase sur la chromatine (Figure 1). L'intensité de fluorescence obtenue avec les différents siRNAs a été comparée à celle obtenue dans des cellules transfectées avec un siRNA contrôle. Pour qu'un

gène soit retenu comme candidat, deux siRNAs sur trois devaient avoir le même effet. Cette analyse a permis de mettre en évidence 168 gènes candidats : 81 gènes inhibaient le recrutement d'OGG1 sur la chromatine, et 87 permettaient à l'inverse d'augmenter ce recrutement. Les 168 gènes candidats ont été confirmés par l'utilisation de quatre nouveaux siRNAs. Une fois encore les candidats étaient retenus à condition que trois siRNAs sur quatre confirment les résultats obtenus avec la première analyse. Dans ce projet nous nous sommes intéressés aux gènes dont l'inactivation entraînait une inhibition du recrutement d'OGG1.

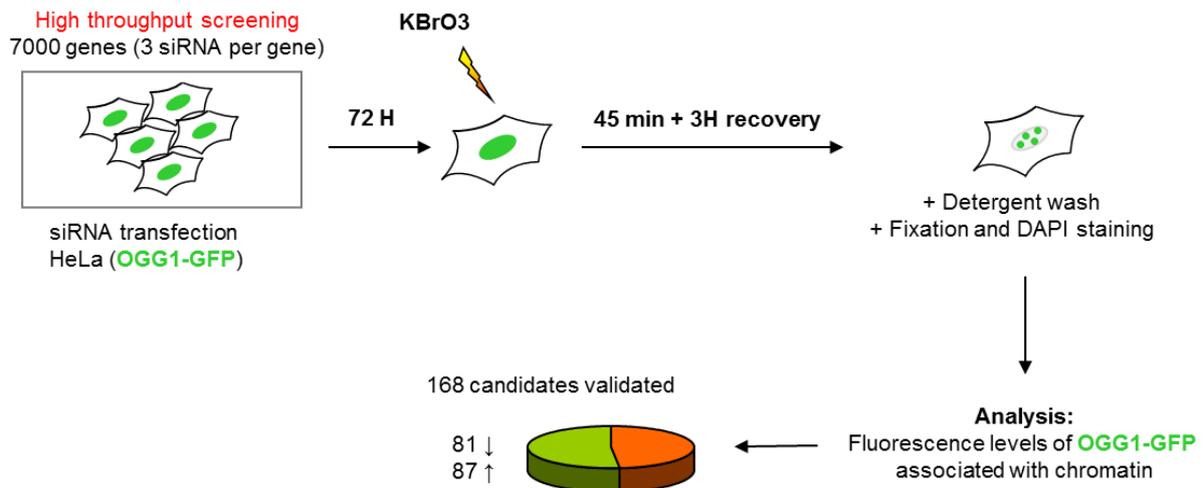


Figure 1 : Principe du crible siRNA à haut débit. Des cellules Hela OGG1-GFP ont été transfectées par des siRNAs ciblant 7000 gènes. Chaque gène a été ciblé par 3 siRNAs différents. Après 72h de transfection les cellules ont été traitées par 40 Mm de KBrO3 pendant 45 min. Le traitement a été remplacé par du milieu de culture complet pendant 3h, puis les cellules ont été lavées avec un tampon CSK avant d'être fixées par de la PFA 2%. Enfin les noyaux ont été marqués au DAPI. L'intensité de fluorescence correspondant à la fraction OGG1-GFP retenue sur la chromatine a été mesurée, révélant les gènes candidats entraînant une augmentation (87 candidats) ou une diminution (81 candidats) du recrutement d'OGG1 sur la chromatine.

Parmi les 81 siRNAs entraînant une diminution du recrutement d'OGG1, deux groupes de protéines ont attiré notre attention : trois d'entre elles codent pour des sous-unités du complexe des cohésines (SMC1, SMC3 et RAD21), et trois autres pour des composants du complexe du Médiateur de la transcription (MED12, MED14 et MED24). Les résultats obtenus avec le crible ont été confirmés par notre laboratoire. L'efficacité des siRNAs contre SMC3, RAD21, MED12 et MED14 a tout d'abord été vérifiée par western blot en utilisant des anticorps spécifiques (Figure 2A). Le recrutement chromatinien d'OGG1-GFP a ensuite été suivi par microscopie dans des cellules transfectées par un siRNA contrôle, ou deux siRNAs différents contre les composants du Médiateur et des cohésines (siMED12, siMED14, siSMC1, siSMC3, siRAD21). Le recrutement d'OGG1-GFP s'est montré fortement diminué en présence des siRNAs ciblant le Médiateur et les cohésines (Figure 2B). L'intensité de fluorescence de la fraction d'OGG1-GFP retenue sur la chromatine avec chaque siRNA a été quantifiée (Figure

2C), confirmant la forte diminution du recrutement d'OGG1 en absence des composants du Médiateur et des cohésines.

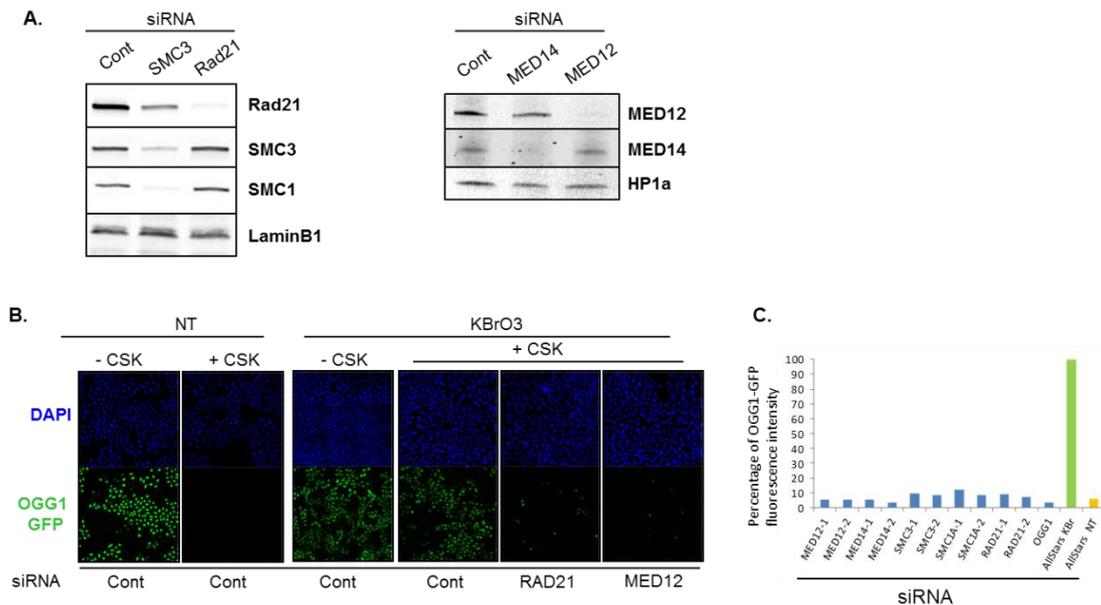


Figure 2 : La relocalisation d'OGG1 sur la chromatine est dépendante des complexes Médiateur et cohésines. **A.** L'efficacité des siRNAs contre SMC3, RAD21, MED12 et MED14 a été vérifiée par western blot. Des anticorps contre la lamine B1 et HP1 α ont été utilisés comme contrôles de charge. **B.** Cellules Hela surexprimant OGG1-GFP transfectées avec les différents siRNAs indiqués. En condition non traitée, OGG1 n'est pas retenue sur la chromatine (NT+CSK, deuxième panel). OGG1 est recrutée sur la chromatine après traitement par KBrO₃ à la dose de 40 mM pendant 45 min (troisième panel). Ce recrutement est cependant inhibé en présence de siRNAs contre les sous-unités du Médiateur (MED12) et des cohésines (RAD21). **C.** Quantification de l'intensité de fluorescence de la fraction OGG1-GFP retenue sur la chromatine dans les cellules transfectées par les différents siRNAs. Le recrutement dans les cellules transfectées par un siCont est fixé à 100%.

Parmi les gènes candidats identifiés par le crible se trouvait la sous-unité MED12. Cette sous-unité appartient au module CDK du Médiateur, qui s'associe de façon transitoire et réversible avec les autres modules du Médiateur et participe à la régulation de la transcription (Taatjes et al., 2002; Tsai et al., 2013). Le module CDK est composé de quatre sous-unités (MED12, MED13, CDK8 et la cycline C (CyC)) qui sont généralement associées. L'effet de l'inactivation des trois autres sous-unités du module sur le recrutement d'OGG1 a donc été testé. L'efficacité des siRNAs a tout d'abord été vérifiée par western blot en utilisant des anticorps spécifiques (Figure 3A). Des cellules Hela OGG1-GFP ont ensuite été transfectées par un siRNA contrôle (siCont) ou un siRNA contre MED12, MED13, CDK8 et la CyC, traitées (K3) ou non (NT) avec du KBrO₃, et laissées récupérer pendant trois heures avant d'être lavées par un tampon CSK et fixées. Les intensités de fluorescence de la fraction OGG1-GFP retenue sur la chromatine ont été normalisées par la moyenne obtenue dans la condition siCont+K3 afin de comparer les valeurs obtenues avec les quatre autres siRNAs. L'analyse des intensités de fluorescence a révélé une diminution significative de l'intensité normalisée dans la condition K3 pour les quatre siRNAs (MED12, MED13, CDK8 et CyC), en comparaison de la condition

contrôle siCont+K3 (Figure 3B). Cependant, l'effet obtenu semble être plus important pour les sous-unités MED12 et MED13 par rapport aux sous-unités CDK8 et CyC (moyennes de fluorescence normalisée de 0.23 et 0.32 contre 0.72 et 0.69 respectivement) (Figure 3C).

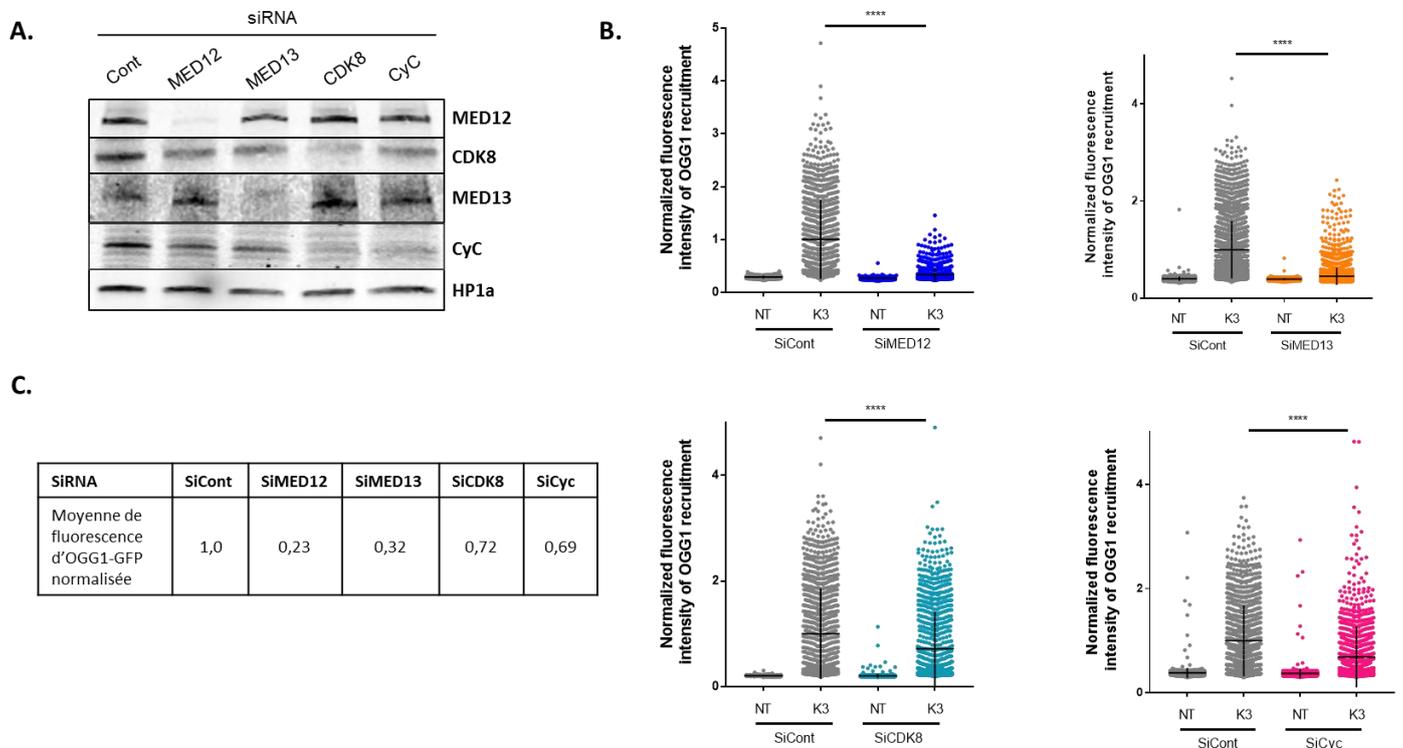


Figure 3 : La relocalisation d'OGG1 sur la chromatine est dépendante de la présence des sous-unités du module CDK. **A.** L'efficacité des siRNAs contre MED12, MED13, CDK8 et la CyC a été vérifiée par western blot. Un anticorps contre HP1 α a été utilisé comme contrôle de charge. **B.** Quantification des intensités de fluorescence d'OGG1 avant (NT) et après traitement (K3) par KBrO₃ sur la fraction chromatiniennne (+CSK) dans des cellules Hela OGG1-GFP transfectées par un siCont ou un siRNA contre les sous-unités MED12, MED13, CDK8 et CyC. Les intensités ont été normalisées par la moyenne obtenue dans la condition siCont+K3 dans chaque expérience. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les différentes conditions. Pour chaque condition $n > 600$ cellules ; (****) $P < 0.0001$. **C.** Comparaison des moyennes d'intensités de fluorescence de la GFP pour chaque siRNA, normalisées par la moyenne obtenue pour la condition siCont+K3.

Les résultats obtenus jusqu'ici ont donc mis en avant un rôle crucial de certaines sous-unités des complexes Médiateur et cohésines dans la relocalisation d'OGG1 sur la chromatine après traitement par KBrO₃. Les sous-unités composant ces deux complexes étant nombreuses (plus d'une trentaine au total), certaines sous-unités ont été sélectionnées pour la suite de nos études : la sous-unité *MED12* pour représenter le module CDK, c'est-à-dire celle identifiée par le crible ; la sous-unité *MED14* pour le corps du Médiateur, MED14 étant la sous-unité centrale du corps et ayant également été identifiée par le crible ; la sous-unité *SMC3* pour le complexe cohésines, l'inactivation de cette protéine permettant de déstabiliser les trois composantes de l'anneau cohésines (Figure 2A).

III. Peut-on généraliser les effets observés ?

Le crible à haut débit nous a permis de mettre en évidence la nécessité de certaines sous-unités du Médiateur et des cohésines pour le recrutement d'OGG1, suite à un stress oxydatif produit par KBrO_3 . Nous avons tout d'abord cherché à savoir si les complexes cohésines et Médiateur pouvaient avoir un rôle plus global dans la voie du BER, c'est-à-dire : 1) est-ce que la nécessité de ces complexes dépend du type de stress oxydatif appliqué sur les cellules ? 2) est-ce que le rôle du Médiateur et des cohésines peut s'appliquer à d'autres enzymes de la voie du BER ?

1. Rôles du Médiateur suite à un stress oxydatif induit par H_2O_2

L'ensemble du crible a été réalisé avec le KBrO_3 comme stress oxydatif de référence. L'utilisation du KBrO_3 comme stress oxydatif pour induire le recrutement d'OGG1, et la formation de 8-oxoG, ont été caractérisées par le passé, par notre laboratoire (Amouroux et al., 2010; Campalans et al., 2015) et par d'autres (Arai et al., 2002; Ballmaier and Epe, 2006). Cependant le KBrO_3 ne représente pas une source endogène de stress oxydatif, et sa présence dans notre environnement reste très réduite. C'est pourquoi nous avons utilisé le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), une source endogène de stress oxydatif, pour suivre le recrutement d'OGG1 et l'impact du Médiateur sur celui-ci.

Nous avons dans un premier temps comparé l'effet de différentes doses de H_2O_2 sur le recrutement d'OGG1. Des cellules Hela OGG1-GFP ont été traitées avec différentes doses de H_2O_2 préparées dans du milieu complet pendant 4h, sans changer le milieu (cette durée correspond quasiment aux 45 min de KBrO_3 auxquelles sont ajoutées les 3h de récupération). Les doses testées étaient de 0.5, 1 et 2 mM. Alors que nous n'avons pas détecté le recrutement d'OGG1 avec la dose de 0.5 mM de H_2O_2 , nous avons pu observer un recrutement d'OGG1 4h après le traitement des cellules par 1 et 2 mM de H_2O_2 (Figure 4A).

Sachant maintenant que le peroxyde d'hydrogène peut induire la relocalisation d'OGG1, nous avons ensuite testé l'effet de différents siRNAs contre les sous-unités du Médiateur dans ces mêmes conditions. Nous avons décidé de garder la dose de 1 mM pour induire le stress oxydatif, cette dose paraissant suffisante pour induire un recrutement significatif d'OGG1 (Figure 4A et B). La transfection des cellules Hela OGG1-GFP avec des siRNAs contre les sous-unités MED12 ou MED14 a entraîné dans les deux cas une diminution significative du recrutement d'OGG1, en comparaison des cellules transfectées par un siCont (Figure 4B). Ces résultats nous permettent de conclure que le Médiateur est nécessaire au recrutement d'OGG1 sur la chromatine suite à une exposition des cellules à différents types de stress oxydatif, que ce soit par KBrO_3 ou par H_2O_2 .

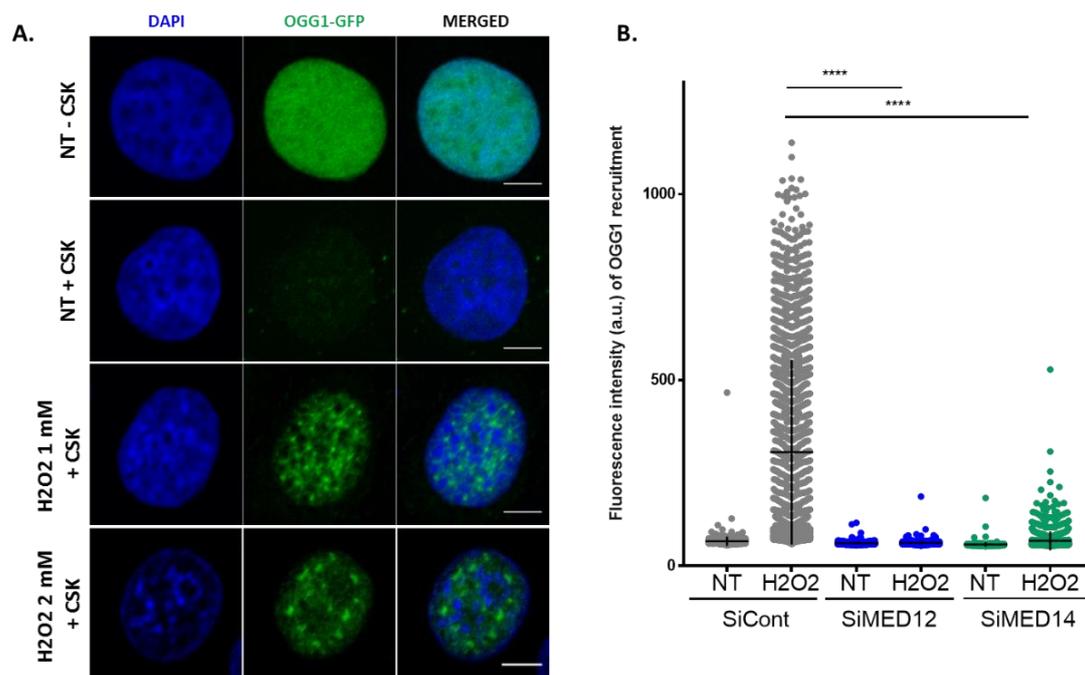


Figure 4 : La relocalisation d’OGG1 sur la chromatine induite par H₂O₂ dépend du Médiateur.
A. Recrutement d’OGG1 sur la chromatine (+CSK) 4h après un traitement par 1 ou 2 mM de H₂O₂. Echelle : 5 µm. **B.** Quantification de l’intensité de fluorescence d’OGG1 sur la fraction chromatinienne avant (NT) et après traitement par H₂O₂ 1 mM, dans des cellules HeLa OGG1-GFP transfectées par un siRNA contrôle, ou des siRNA ciblant les sous-unités du Médiateur MED12 (siMED12) ou MED14 (siMED14). Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les différentes conditions. Pour chaque condition $n > 500$ cellules ; (****) $P < 0.0001$.

2. Rôle du Médiateur et des cohésines sur la relocalisation d’autres enzymes du BER

a. Rôle du Médiateur et des cohésines sur la relocalisation d’autres ADN glycosylases

Notre projet de recherche est centré sur les facteurs qui influencent la relocalisation d’OGG1, l’enzyme responsable de la réparation de la 8-oxoG. Cependant les ADN glycosylases sont multiples chez l’homme, chaque lésion étant reconnue et excisée par une enzyme spécifique. Nous avons cherché à savoir si le Médiateur et les cohésines pourraient intervenir dans la prise en charge d’autres types de bases oxydées. Pour cela, nous avons donc étudié le rôle de ces complexes sur la relocalisation de NTH1 après une exposition des cellules à un stress oxydant, l’enzyme capable de prendre en charge les pyrimidines oxydées (Ikeda et al., 1998).

Afin d’étudier parallèlement le recrutement d’OGG1 et de NTH1 par microscopie, des cellules HeLa ont été co-transfectées par des plasmides codant pour les protéines de fusion OGG1-mCherry et NTH1-GFP. Les cellules ont été traitées par du KBrO₃ à la dose de 40 mM pendant 45 min, puis incubées dans du milieu complet sans KBrO₃ pendant 3h, avant d’être

fixées avec de la PFA 2%. Nous avons pu constater que ni OGG1 ni NTH1 n'étaient retenues sur la chromatine avant le traitement par KBrO_3 (Figure 5A, condition NT+CSK). Cependant, les deux enzymes étaient recrutées sur la chromatine 3h après le traitement (Figure 5A, condition K3+CSK). De plus, la localisation de ces deux enzymes sur la chromatine après traitement était similaire. L'analyse du coefficient de Pearson (coefficient de corrélation) dans cette condition sur une dizaine de cellules a permis de confirmer une bonne co-localisation d'OGG1 et de NTH1 (coefficient de Pearson = 0,95) (Figure 5B, dernier panel). Ces données indiquent un recrutement d'OGG1 et de NTH1 dans les mêmes régions nucléaires après un stress oxydatif.

Le rôle du Médiateur et des cohésines a ensuite été testé grâce à la transfection de siRNAs ciblant soit le Médiateur (siMED14) soit les cohésines (siSMC3). Nous avons tout d'abord pu confirmer l'effet de ces deux siRNAs sur le recrutement d'OGG1, qui était significativement diminué en présence de ces siRNAs en comparaison des cellules transfectées avec un siCont (Figure 5C, graphique du haut). Le recrutement de NTH1 était également diminué de façon significative en absence de MED14 (siMED14) ou SMC3 (siSMC3) en comparaison des cellules contrôles (siCont) (Figure 5C, graphique du bas). Il apparaît donc que le Médiateur et les cohésines soient essentiels au recrutement de plusieurs ADN glycosylases, dont OGG1 et NTH1.

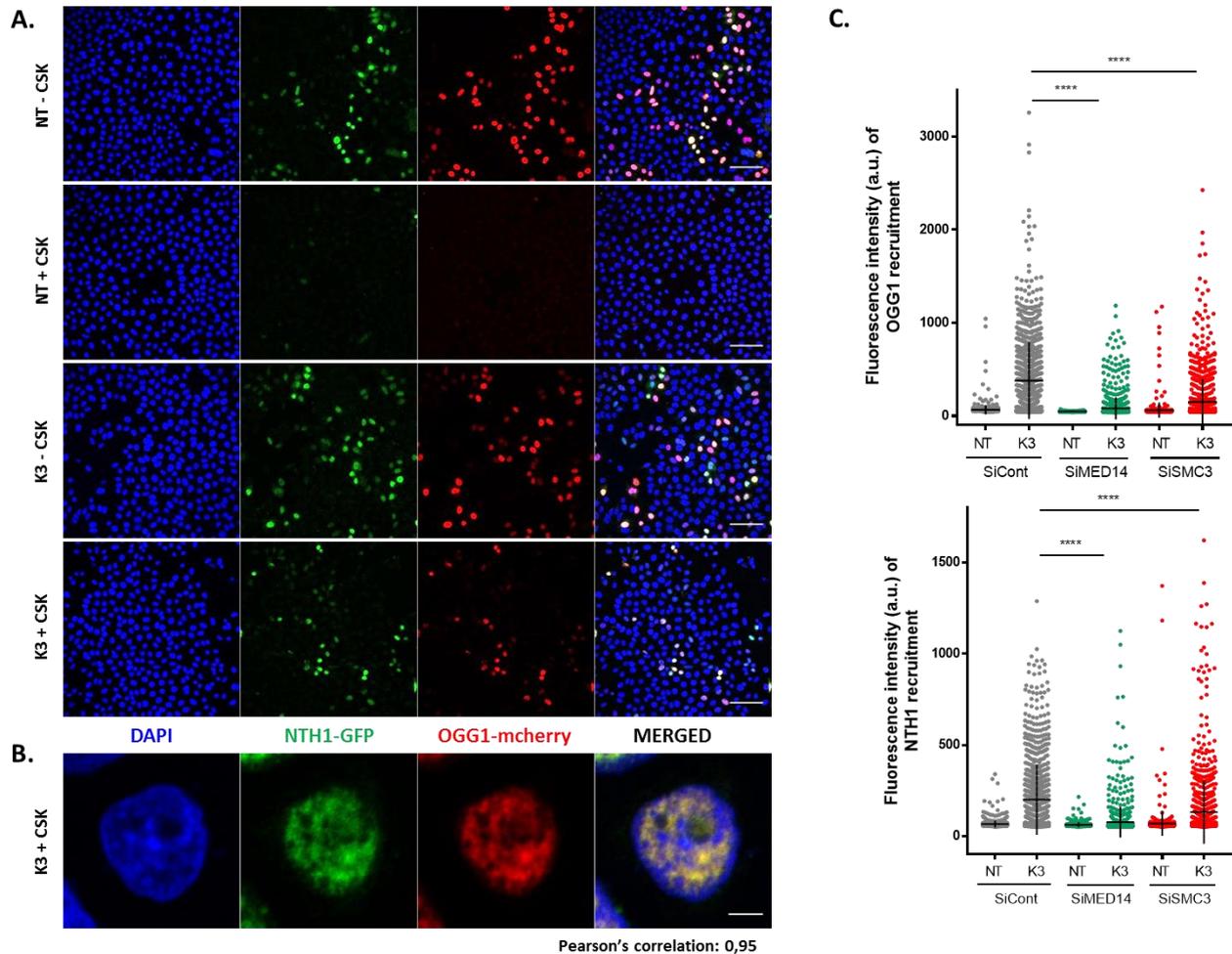


Figure 5 : Le Médiateur et les cohésines sont nécessaires à la relocalisation de plusieurs ADN glycosylases sur la chromatine. A et B. Distributions intracellulaires d'OGG1-mCherry et NTH1-GFP co-transfectées dans des cellules HeLa avant (NT) et après traitement (K3) par KBrO_3 , dans l'ensemble du noyau (-CSK) et sur la fraction chromatiniennne (+CSK). Echelles : 50 μm (A), et 5 μm (B). **C.** Quantification des intensités de fluorescence d'OGG1 (haut) et de NTH1 (bas) sur la fraction chromatiniennne (+CSK) avant (NT) et après traitement (K3) par KBrO_3 dans des cellules co-transfectées par les mêmes plasmides et par un siCont, un siSMC3 et un siMED14. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les différentes conditions. Pour chaque condition $n > 500$ cellules ; (****) $P < 0.0001$.

b. Rôle du Médiateur et des cohésines sur le recrutement de XRCC1

Parmi les enzymes qui participent à la réparation des bases oxydées, XRCC1 possède une place particulière, puisqu'elle intervient à la fois dans la voie du BER et dans la réparation des cassures simples brin (Caldecott, 2003b; Marsin et al., 2003). Cette protéine d'échafaudage permet de coordonner les différentes étapes du BER sans pour autant posséder d'activité enzymatique propre. Lorsque celle-ci est impliquée dans la voie du BER, sa relocalisation a lieu plusieurs heures après la formation des dommages, ce qui correspond au moment où les ADN glycosylases sont relocalisées sur la chromatine pour initier la réparation (Campalans et al., 2005, 2015). Il a également été montré que son recrutement sur la chromatine était

dépendant de son interaction avec OGG1 (Campalans et al., 2015). Connaissant maintenant le rôle des complexes Médiateur et cohésines sur la relocalisation d’OGG1 après un stress oxydatif, nous avons exploré leur rôle sur le recrutement de XRCC1.

Des cellules Hela ont été co-transfectées par des plasmides codant pour les protéines de fusion XRCC1-GFP et OGG1-mCherry. Les cellules ont été traitées ou non par 40 mM de KBrO₃, puis traitées de la même façon que décrit précédemment (Figure 5). Une relocalisation d’OGG1 et de XRCC1 dans des régions similaires du noyau a été observée 3h après la fin du traitement par KBrO₃ (Figure 6A). De plus, cette relocalisation s’est vue significativement diminuée en absence du Médiateur (siMED14) et des cohésines (siSMC3) (Figure 6A et B). Ces données mettent en avant un recrutement d’OGG1 et de XRCC1 dépendant des deux complexes, Médiateur et cohésines, prouvant encore une fois le rôle de ces complexes sur la relocalisation de plusieurs enzymes de la voie du BER.

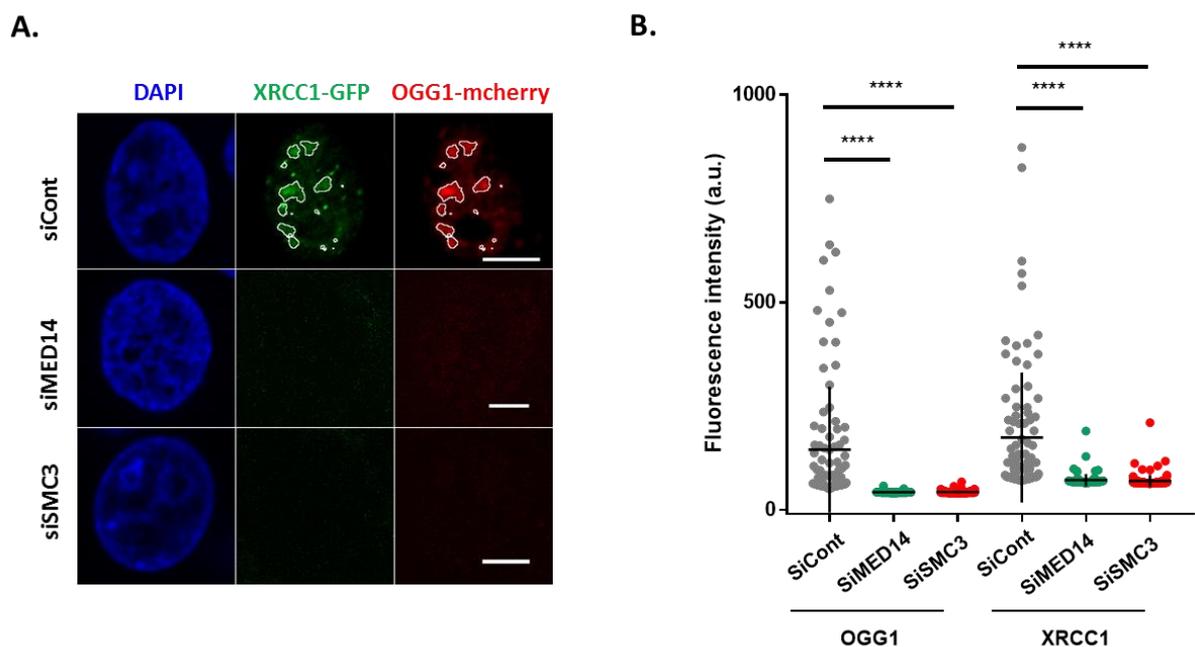


Figure 6 : La relocalisation d’OGG1 et de XRCC1 est dépendante des cohésines et du Médiateur.
A. Distributions intracellulaires d’OGG1-mCherry et XRCC1-GFP co-transfectées dans des cellules Hela et transfectées par un siCont, un siSMC3 et un siMED14, après traitement (K3) par KBrO₃, sur la fraction chromatiniennne (+CSK). Echelle : 5 µm. Un masque sur les foci OGG1 a été réalisé par ImageJ dans la condition contrôlée. **B.** Quantification des intensités de fluorescence d’OGG1 et de XRCC1 dans les mêmes conditions. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les différentes conditions. Pour chaque condition $n > 100$ cellules ; (****) $P < 0.0001$.

IV. Le rôle des cohésines et du Médiateur est-il dépendant du cycle cellulaire ?

Une des raisons justifiant d’étudier spécifiquement les cohésines parmi tous les candidats identifiés par le crible était son implication récente dans un autre système de réparation, celui des cassures double brin (CDB) (Sonoda et al., 2001; Ström et al., 2004). La réparation des CDB nécessite les cohésines spécifiquement pendant les phases S et G2 du cycle

cellulaire. En effet, la réparation des CDB pendant les phases S et G2 se fait majoritairement par RH, voie qui utilise la chromatide sœur intacte, et qui nécessite donc une forte proximité des deux chromatides sœurs (Dorsett and Ström, 2012). Cela nous a naturellement menés à la question suivante : le rôle des cohésines dans la réparation par le BER est-il spécifique d'une phase du cycle cellulaire ?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé différents marqueurs, permettant de discriminer chaque phase du cycle : l'incorporation d'Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) nous a permis de marquer les cellules en phase S et l'expression de CENP-F les cellules en phase G2. Par élimination, les cellules ne possédant aucun de ces marqueurs étaient considérées en phase G1. Nous avons dans un premier temps suivi le recrutement d'OGG1 en fonction du cycle cellulaire dans des cellules Hela-OGG1-GFP. L'utilisation des différents marqueurs cités précédemment nous a permis d'observer un recrutement d'OGG1 dans toutes les phases du cycle, c'est-à-dire en phase G1, S et G2 (Figure 7A et B). L'effet des cohésines et du Médiateur sur le recrutement d'OGG1 a de nouveau été testé grâce à l'utilisation de siRNAs : les siMED12 et siMED14 pour le Médiateur, et le siSMC3 pour les cohésines. La quantification de l'intensité de fluorescence d'OGG1 dans chaque phase du cycle et pour chaque siRNA nous a permis d'observer une diminution significative du recrutement de la protéine dans toutes les phases du cycle en absence du Médiateur et des cohésines (Figure 7B). Les cohésines et le Médiateur sont donc essentiels au recrutement d'OGG1 tout au long du cycle cellulaire.

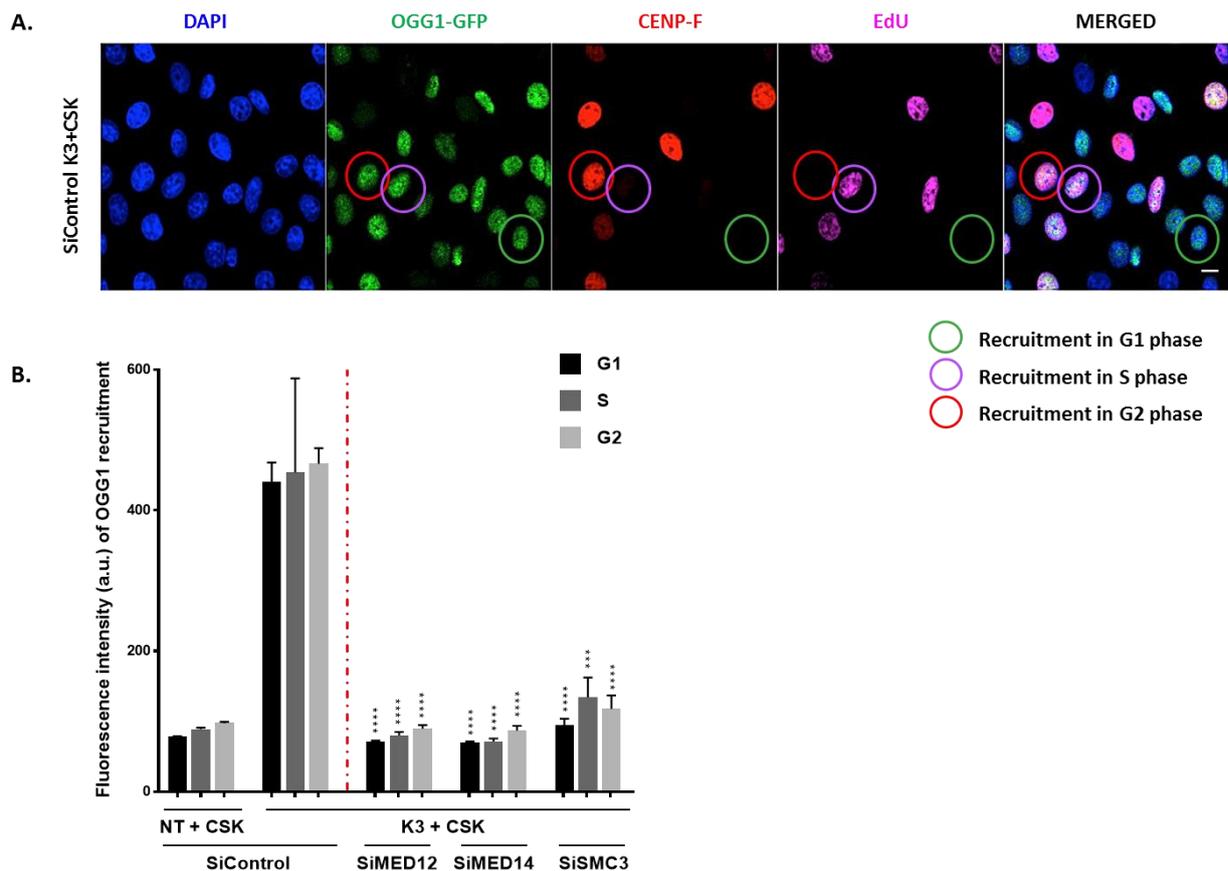


Figure 7 : Le Médiateur et les cohésines sont nécessaires au recrutement d’OGG1 tout au long du cycle cellulaire. **A.** Relocalisation d’OGG1-GFP sur la chromatine (+CSK) après traitement (K3) par KBrO_3 en phase G1 (marquage vert seul), S (marquages vert et magenta), et G2 (marquages vert et rouge) dans des cellules HeLa OGG1-GFP. Echelle : 10 μm . **B.** Quantification du recrutement d’OGG1 sur la chromatine après traitement par KBrO_3 dans chaque phase du cycle dans des cellules HeLa OGG1-GFP transfectées par un siCont, ou un siMED12, un siMED14 et un siSMC3. Le graphique représente la médiane des valeurs avec l’intervalle de confiance à 95%. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer l’effet des différents siRNAs en comparaison du siRNA contrôle pour chaque phase du cycle (K3+CSK). Pour chaque siRNA $n = 500 - 1000$ cellules. (***) $P < 0.001$; (****) $P < 0.0001$.

V. Quels sont les effets de l’absence du Médiateur sur l’excision de la 8oxo-G ?

1. Cinétique de réparation de la 8-oxoG

La fonction intrinsèque d’OGG1 est la réparation de la lésion 8-oxoG (Bruner et al., 2000). La cinétique de réparation de cette lésion a été caractérisée par le passé, en comparant des cellules HeLa et des cellules HeLa surexprimant la forme OGG1 (HeLa OGG1-GFP) (Amouroux et al., 2010). Cette étude a permis de mettre en évidence une cinétique de réparation plus rapide lorsqu’OGG1 est surexprimée, qui atteint un taux maximum entre 2h et 4h post-

traitement. La technique de l'élution alcaline avait été utilisée pendant cette étude pour quantifier la quantité de lésions. Une des limitations de cette technique est le grand nombre de cellules nécessaires à la quantification et l'incapacité de suivre la réponse en cellule unique. Lors de ce projet nous avons donc voulu optimiser l'utilisation d'un anticorps spécifique contre la 8-oxoG afin de pouvoir suivre la réparation de la lésion. Afin de valider l'utilisation de cet anticorps, nous avons comparé les cinétiques de réparation de la 8-oxoG en utilisant trois techniques différentes : l'élution alcaline, l'immunofluorescence et la Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Les études par élution alcaline et HPLC ont respectivement été prises en charge par les laboratoires de Bernd Epe (Université de Mainz) et Jean-Luc Ravanat (CEA de Grenoble), tandis que l'immunofluorescence a été réalisée au sein de notre laboratoire. Pour réellement comparer ces différentes approches, un même lot de cellules a été traité au KBrO_3 , et les cellules récupérées à des temps différents post-traitement : juste après la fin du traitement (K0), et 3, 6 et 9 heures après la fin du traitement (K3 / K6 / K9 respectivement). Ce lot de cellules a ensuite été analysé parallèlement par les différentes techniques. Nous avons pu observer des cinétiques de réparation comparables avec les trois types de quantification (Figure 8). Ces résultats nous permettent de valider l'utilisation de l'immunofluorescence pour quantifier la lésion 8-oxoG, technique utilisée par notre laboratoire.

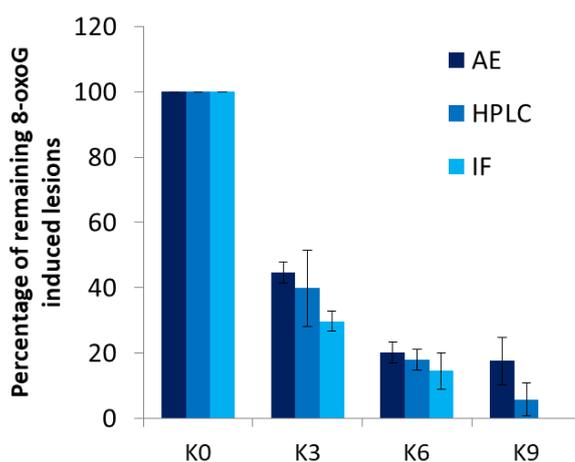


Figure 8 : La cinétique de réparation de la 8-oxoG par trois approches différentes. Quantification des lésions 8-oxoG par élution alcaline (AE), Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et immunofluorescence (IF) dans des cellules Hela OGG1-GFP traitées par KBrO_3 et récupérées à des temps différents post-traitement : juste après la fin du traitement (K0), 3h (K3), 6h (K6) et 9h (K9) après l'arrêt du traitement. La quantité de lésions 8-oxoG dans les cellules non traitées a été soustraite aux autres conditions. Le graphique représente le pourcentage de lésions 8-oxoG dans chaque condition, rapporté à 100% de lésions dans la condition K0. N = 3 expériences.

2. Rôle du Médiateur sur la cinétique de réparation de la 8-oxoG

La réparation de la 8-oxoG étant la fonction intrinsèque d'OGG1, nous voulions savoir si le recrutement de l'enzyme, influencée par la présence du Médiateur et des cohésines, était nécessaire à cette activité de réparation. Mais avant tout, nous avons voulu nous assurer que l'activité enzymatique d'OGG1 était conservée dans des cellules Hela invalidées de sous-unités du Médiateur ou des cohésines. Pour ce faire, nous avons testé l'activité d'OGG1 dans des extraits protéiques de cellules Hela OGG1-GFP transfectées par un siRNA contrôle, un siMED14, un siMED12 ou un siSMC3. Le principe du test d'activité est d'incuber des oligonucléotides contenant des lésions 8-oxoG avec différentes quantités d'extraits protéiques (0, 3 ou 6 µg). Nous suivons ensuite la quantité de produit clivé dans chaque condition. Dans les cellules contrôles (siCont), la quantité de produit clivé augmente avec la quantité d'extrait ajoutée dans le système, ce qui traduit l'activité de clivage de la 8-oxoG par OGG1. Des résultats similaires ont été retrouvés en présence des différents siRNAs, confirmant l'intégrité de l'activité enzymatique d'OGG1 dans ces conditions (Figure 9A et B).

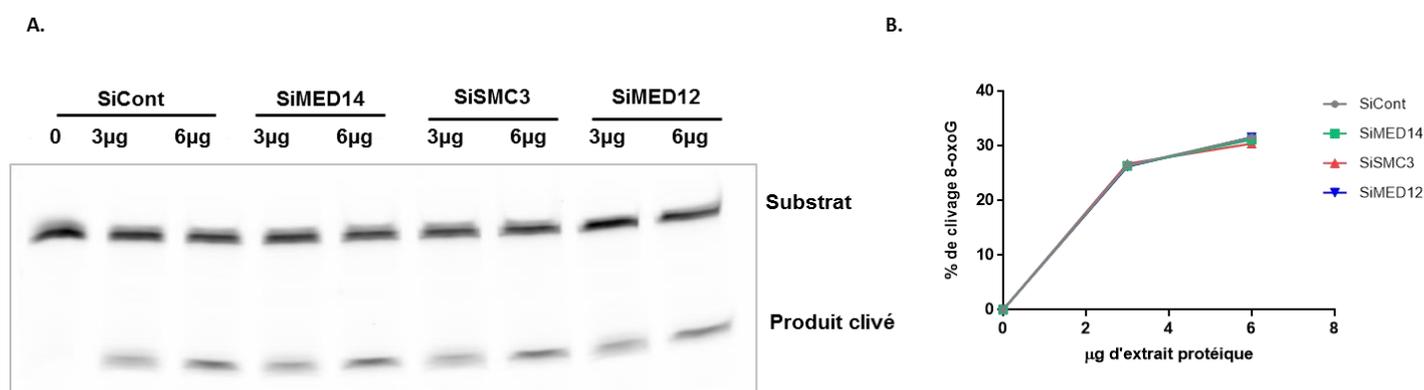


Figure 9 : L'activité enzymatique d'OGG1 n'est pas affectée par l'absence de sous-unités du Médiateur ou des cohésines. **A.** Clivage d'un oligonucléotide contenant de la 8-oxoG marquée en 5' par Cy5 (substrat) par un extrait protéique obtenu à partir des cellules Hela sur-exprimant OGG1-GFP. La même quantité d'oligonucléotide a été incubée avec des quantités croissantes (0, 3 et 6 µg) d'extrait protéique. Le produit de la réaction a été migré en gel dénaturant et le clivage de l'oligonucléotide a été évalué pour des cellules transfectées par un siCont, un siMED14, un siSMC3 et un siMED12. **B.** L'intensité des bandes des substrats et des produits clivés a été quantifiée afin d'obtenir le pourcentage de clivage dans les cellules transfectées par les différents siRNAs en fonction de la quantité d'extrait OGG1 ajoutée.

Nous avons finalement suivi la cinétique de réparation de la 8-oxoG dans des cellules Hela OGG1-GFP transfectées par un siCont ou un siMED14. Les lésions 8-oxoG ont été marquées par immunofluorescence dans des cellules non traitées (NT) ou traitées par KBrO₃, aux temps K0 et K3. Dans la condition contrôle, nous avons pu observer une réparation de la majorité des lésions 3h après la fin du traitement par KBrO₃. A l'inverse, une persistance significative des lésions a été observée dans l'ensemble du noyau au temps K3 en absence du Médiateur (siMED14), en comparaison de la condition contrôle (Figure 10A et B). L'analyse en 3D des lésions dans l'ensemble du volume nucléaire a de plus mis en évidence une

hétérogénéité du volume des lésions, particulièrement en absence du Médiateur (Figure 10A et D). Cette analyse a révélé des foci plus nombreux (Figure 10C) et plus volumineux (Figure 10D) en absence de la sous-unité MED14 du Médiateur en comparaison de la condition contrôle au temps K3. L'ensemble de ces résultats met en avant la nécessité du Médiateur pour la réparation de la 8-oxoG et suggère que l'association d'OGG1 à la chromatine après stress oxydatif soit nécessaire pour la prise en charge de la 8oxoG et l'initiation de la réparation par la voie BER. En absence de celui-ci les lésions sont moins réparées 3h après la fin du traitement oxydatif, les foci devenant même de plus en plus volumineux au cours du temps (Figure 10D).

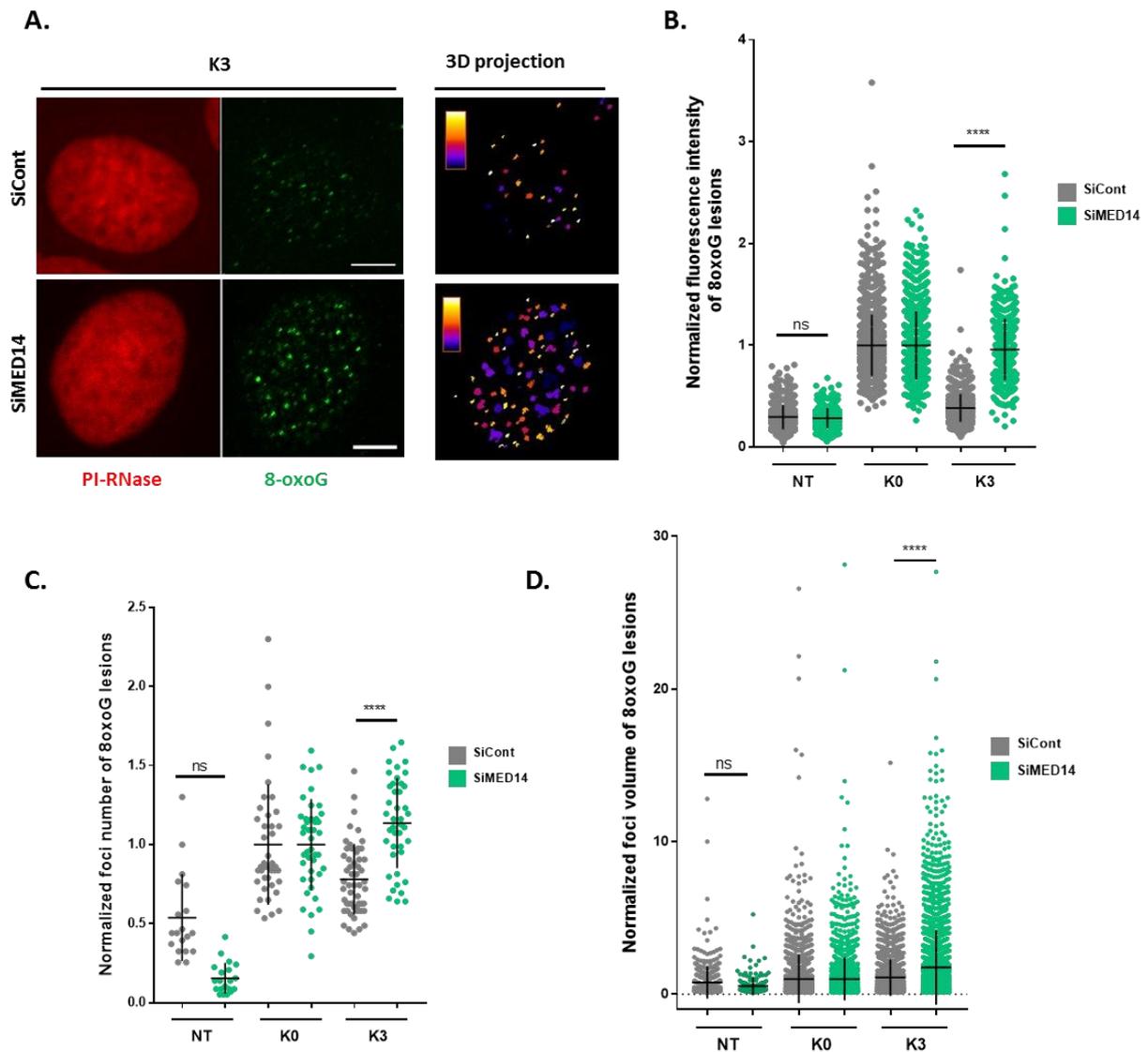


Figure 10 : La réparation de la 8-oxoG nécessite la présence du Médiateur. **A.** Visualisation des foci 8-oxoG (vert) par microscopie confocale 3h post-traitement (K3) dans des cellules HeLa OGG1-GFP transfectées par un siCont et un siMED14. Les noyaux sont marqués par PI-RNase (rouge). Echelle : 5 μ m. La projection maximale de l'image 3D obtenue avec le plugin « 3D object counter » (39 plans par noyau) est présentée dans le panel de droite et montre des foci persistants dans l'ensemble du noyau 3 heures après la fin du traitement (K3). L'échelle dans l'image montre le code couleurs utilisé pour illustrer le volume des foci du plus petit (jaune) aux plus grand (bleu). **B.** Quantification des intensités de fluorescence des lésions 8-oxoG dans des cellules non traitées (NT), et traitées avec du KBrO₃ et récupérées juste après le traitement (K0) ou après 3 heures de récupération dans du milieu (K3). Les intensités de fluorescence ont été normalisées par l'intensité moyenne obtenue au temps K0,

dans des cellules Hela OGG1-GFP transfectées par un siCont et un siMED14. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les différentes conditions. Pour cette analyse un seul plan confocal a été utilisé. Pour chaque condition $n > 600$ cellules. Le nombre (C) et le volume en μm^3 (D) des foci 8-oxoG ont été caractérisés dans les mêmes conditions sur des reconstructions 3D comprenant la totalité du volume nucléaire (39 plans par noyau). Pour chaque condition, $n = 20-50$ cellules (nombre de foci) ; $n > 180$ foci (volume des foci, mesuré sur les mêmes 20-50 cellules par condition).

VI. Quelle est la dynamique des complexes Médiateur et cohésines en réponse au stress oxydant ?

1. Dynamique d'OGG1 et des complexes Médiateur et cohésines en fonction du stress

Sachant qu'OGG1 est recrutée sur la chromatine après un stress, et que ce recrutement dépend du Médiateur et des cohésines, nous avons cherché à caractériser et à comparer la dynamique des complexes Médiateur et cohésines par rapport à celle OGG1 dans un premier temps par western blot. Pour cela, un fractionnement subcellulaire a été effectué sur des cellules non traitées (NT) et 3 heures après traitement par KBrO_3 (K3). La fraction insoluble des protéines a été isolée en lavant les cellules avec du tampon CSK (+ CSK). Cette fraction correspond aux protéines retenues sur la chromatine et la matrice cellulaire. La présence d'OGG1 sur la fraction insoluble uniquement après stress a pu être confirmée par western blot (Figure 11A, première ligne). L'analyse du module CDK du Médiateur a révélé un comportement différentiel des quatre sous-unités le composant : les sous-unités MED12 et CDK8 sont également relocalisées sur la fraction chromatinienne uniquement après traitement par KBrO_3 (Figure 11A). A l'inverse, les sous-unités MED13 et Cycline C (CyC) sont présentes sur la fraction chromatinienne avant et après traitement, similairement au corps du Médiateur, comme l'illustre le comportement de la sous-unité MED14 (Figure 11A). Les sous-unités SMC1, SMC3 et RAD21 du complexe cohésines sont également présentes avant et après traitement sur la fraction chromatinienne (Figure 11B). Les quantités totales de protéines (-CSK) ne sont pas influencées par le traitement par KBrO_3 (Figure 11A et B, deux premières pistes pour chaque western blot).

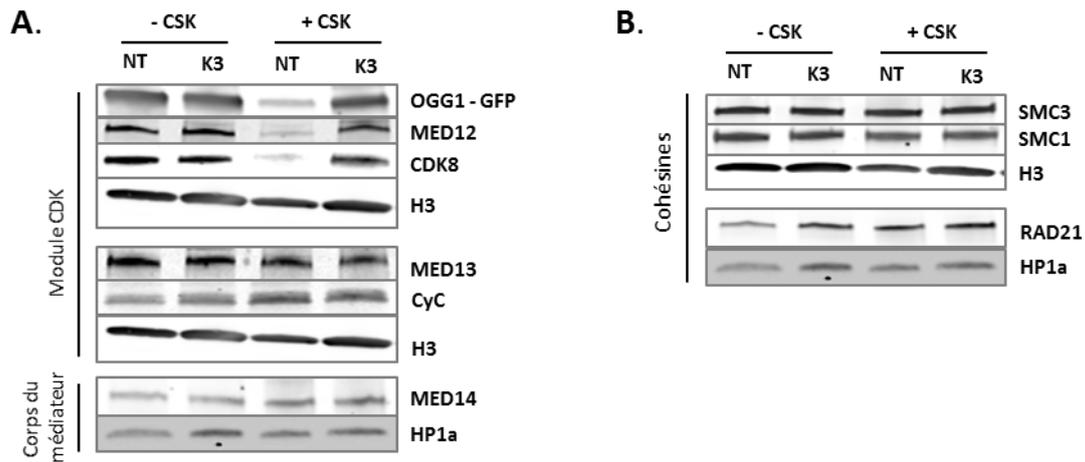


Figure 11 : OGG1, le Médiateur et les cohésines ont des dynamiques différentes en fonction du stress. Fractionnement subcellulaire de cellules Hela OGG1-GFP non traitées (NT) et traitées (K3) par KBrO_3 . Les fractions totales (-CSK) et insoluble (+CSK) ont été analysées par western blot grâce à l'utilisation d'anticorps contre OGG1, MED12, CDK8, la Cycline C (Cyc), MED13, MED14 (A), SMC1, SMC3 et RAD21 (B). Des anticorps contre HP1 α et H3 ont été utilisés comme contrôles de charge.

Nous avons ensuite voulu confirmer ces résultats par microscopie, ce qui nous a également permis de suivre la localisation des différentes protéines au sein du noyau avant (NT) et après traitement (K3), avec ou sans CSK. Le co-recrutement d'OGG1 et des sous-unités CDK8/MED12 sur la chromatine après traitement a ainsi pu être confirmé (Figure 12A et B respectivement, condition K3+CSK). Grâce à la microscopie nous avons pu observer une forte co-localisation d'OGG1 avec ces deux protéines (coefficient de Pearson de 0.9 pour les deux). Cette co-localisation est également visible suite à la mesure des intensités de fluorescence le long de lignes tracées dans le noyau : OGG1 en rouge et CDK8 en vert pour le couple OGG1/CDK8 ; OGG1 en vert et MED12 en rouge pour le couple OGG1/MED12 (Figure 12A et B, graphiques de droite). Le marquage de l'ADN par le DAPI nous a de plus permis de localiser ces co-recrutements dans les domaines du noyau avec une coloration moins dense qui correspondent aux régions d'euchromatine, toutes ces protéines étant totalement exclues du marquage par DAPI. Enfin, la localisation des cohésines par rapport à OGG1 dans ces mêmes conditions a été suivie par immunofluorescence grâce à un anticorps anti-SMC3, confirmant la présence des cohésines avant et après traitement par KBrO_3 sur la chromatine. Une colocalisation partielle des cohésines et OGG1 a été observée dans la fraction insoluble (coefficient de Pearson de 0.71) (Figure 12C). Cette co-localisation partielle est également visible par la mesure des intensités des deux protéines le long de lignées tracées dans le noyau : OGG1 en vert et SMC3 en rouge (Figure 12C, graphique de droite).

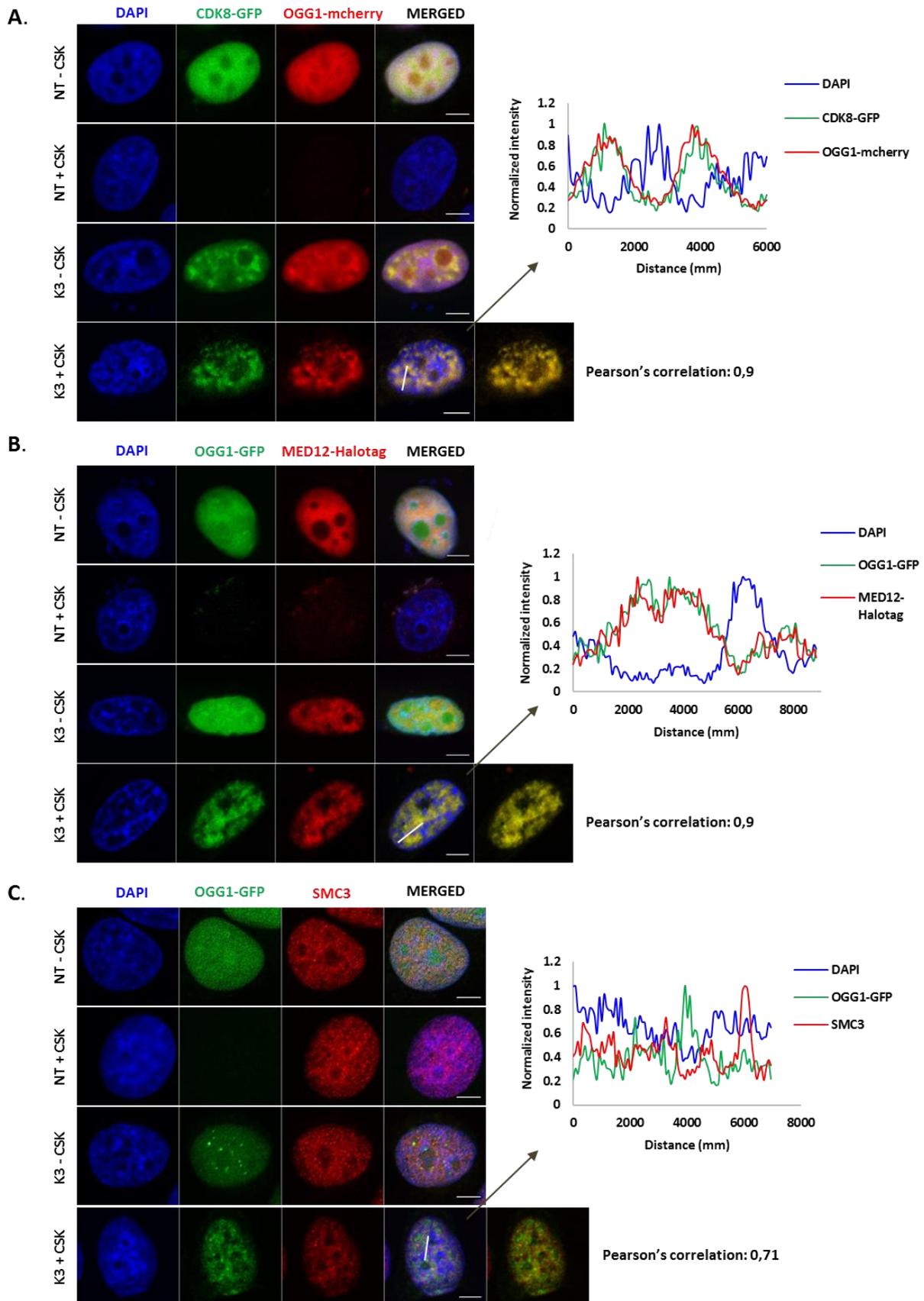


Figure 12 : OGG1, MED12 et CDK8 co-localisent sur la chromatine après un stress oxydatif. Distributions intracellulaires d'OGG1-mCherry/CDK8-GFP (A); OGG1-GFP/MED12-Halotag (B); OGG1-GFP/SMC3 (C) avant (NT) et après traitement (K3), dans l'ensemble du noyau (-CSK) ou sur

la fraction chromatinienne (+CSK). Echelle : 5 μ m. Les graphiques représentent les profils de fluorescence et reflètent la localisation d'OGG1 par rapport à CDK8 (A), MED12 (B) et SMC3 (C). Le marquage DAPI est utilisé pour visualiser les régions où l'ADN est plus ou moins condensé au sein du noyau.

2. Dynamique de CTCF en fonction du stress oxydatif

Il est maintenant bien connu que les cohésines participent à de multiples mécanismes au sein de la cellule, en dehors de leur rôle dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose, tels que la réparation des CDB (Ström et al., 2004; Ünal et al., 2004) ou l'organisation topologique du génome en association avec le facteur CTCF (Zuin et al., 2014). Nous savons également qu'elles peuvent s'associer spécifiquement avec le complexe du Médiateur ou le facteur CTCF, sans jamais co-localiser avec les deux types de protéines en même temps le long du génome (Kagey et al., 2010). Ces résultats indiquent une localisation et donc une fonction différente des cohésines, dépendante des protéines auxquelles elles sont associées. Dans le cas où les complexes Médiateur et cohésines interviennent dans la relocalisation d'OGG1 après stress, la localisation d'OGG1 devrait logiquement être différente du facteur CTCF. Cette hypothèse a été testée en analysant le comportement du facteur CTCF en fonction du stress. Une approche par biochimie a tout d'abord été choisie pour suivre la présence de CTCF dans des cellules Hela OGG1-GFP avant (NT) et après traitement (K3) par KBrO_3 , dans la fraction totale (-CSK) et insoluble (+CSK) du noyau. La présence de CTCF a pu être observée de façon similaire avant et après traitement, dans les fractions totales et insolubles (Figure 13A). On remarque une différence de profil des bandes CTCF en fonction du traitement. Cependant nous n'avons pour l'instant pas d'explication à ce phénomène. La localisation de CTCF a également été étudiée par microscopie dans des cellules Hela OGG1-GFP afin de comparer la localisation des deux protéines. Une immunofluorescence avec un anticorps anti-CTCF nous a permis de marquer la protéine dans les conditions décrites ci-dessus (NT vs K3, +/- CSK). La rétention de CTCF sur la chromatine avant et après traitement a ainsi pu être confirmée (Figure 13B, deuxième et quatrième lignes). La localisation d'OGG1 et de CTCF l'une par rapport à l'autre a également été étudiée, particulièrement dans la condition K3+CSK, révélant une relocalisation d'OGG1 sur la chromatine totalement exclue des sites enrichis en CTCF (Figure 13B). Cette exclusion d'OGG1 par rapport à CTCF est également visible par la mesure des intensités des deux protéines le long d'une lignée tracée dans le noyau : OGG1 en vert et CTCF en rouge (Figure 13B, graphique de droite) et par la mesure du coefficient de Pearson (coefficient de 0.53).

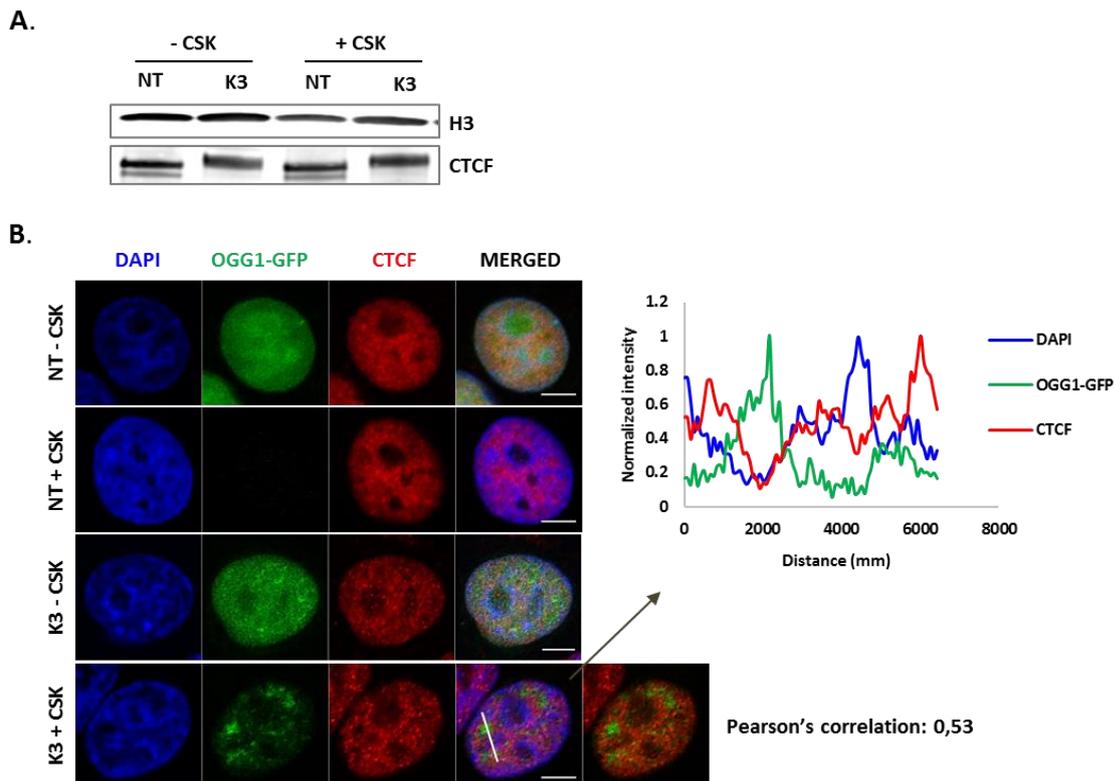


Figure 13 : OGG1 et CTCF possèdent des localisations différentes dans des cellules exposées au stress oxydatif. **A.** Fractionnement subcellulaire (+/- CSK) de cellules Hela OGG1-GFP non traitées (NT) et traitées (K3) par KBrO_3 . La présence de CTCF a été analysée dans chaque condition par western blot grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-CTCF. Un anticorps contre H3 a été utilisé comme contrôle de charge. **B.** Distributions intracellulaires d'OGG1-GFP et CTCF (par immunofluorescence) avant (NT) et après traitement (K3), dans l'ensemble du noyau (-CSK) ou sur la fraction chromatiniennne (+CSK). Echelle : 5 μm . Le profil de fluorescence reflète l'exclusion entre OGG1-GFP et CTCF, toutes les deux majoritairement présentes dans les régions moins denses en ADN (observé par le marquage DAPI).

3. Rôles du Médiateur et des cohésines sur la dynamique des sous-unités du module CDK

Connaissant le rôle des complexes Médiateur et cohésines dans le recrutement d'OGG1, nous avons ensuite exploré leur rôle dans le recrutement des sous-unités MED12 et CDK8 qui suivent le même comportement que l'ADN glycosylase lors d'une exposition des cellules au stress oxydant. Deux approches complémentaires ont été utilisées : la biochimie par western blot et la microscopie. Par microscopie, la co-transfection des plasmides OGG1-mCherry et CDK8-GFP dans des cellules Hela nous a permis de suivre la dynamique de ces protéines en absence des cohésines (siSMC3) et du Médiateur (siMED14) en comparaison de cellules contrôles (siCont). Dans les conditions contrôles nous avons pu confirmer le co-recrutement d'OGG1 et de CDK8 après traitement par KBrO_3 (K3) (Figure 14A et B, condition SiCont+K3). Dans les cellules déficientes en sous-unités SMC3 ou MED14, le recrutement des deux protéines est significativement diminué par rapport à la condition contrôle (Figure 14A et B, conditions SiSMC3/MED14+K3). Ces résultats ont été corroborés par western blot : dans des

cellules Hela OGG1-GFP les protéines OGG1, MED12 et CDK8 sont co-recrutées sur la chromatine après traitement par KBrO_3 , et cette relocalisation sur la chromatine est inhibée en absence des sous-unités MED12 (siMED12) et MED14 (siMED14) (Figure 14C). Les recrutements de MED12 et CDK8 observés par biochimie reflètent le comportement des protéines endogènes.

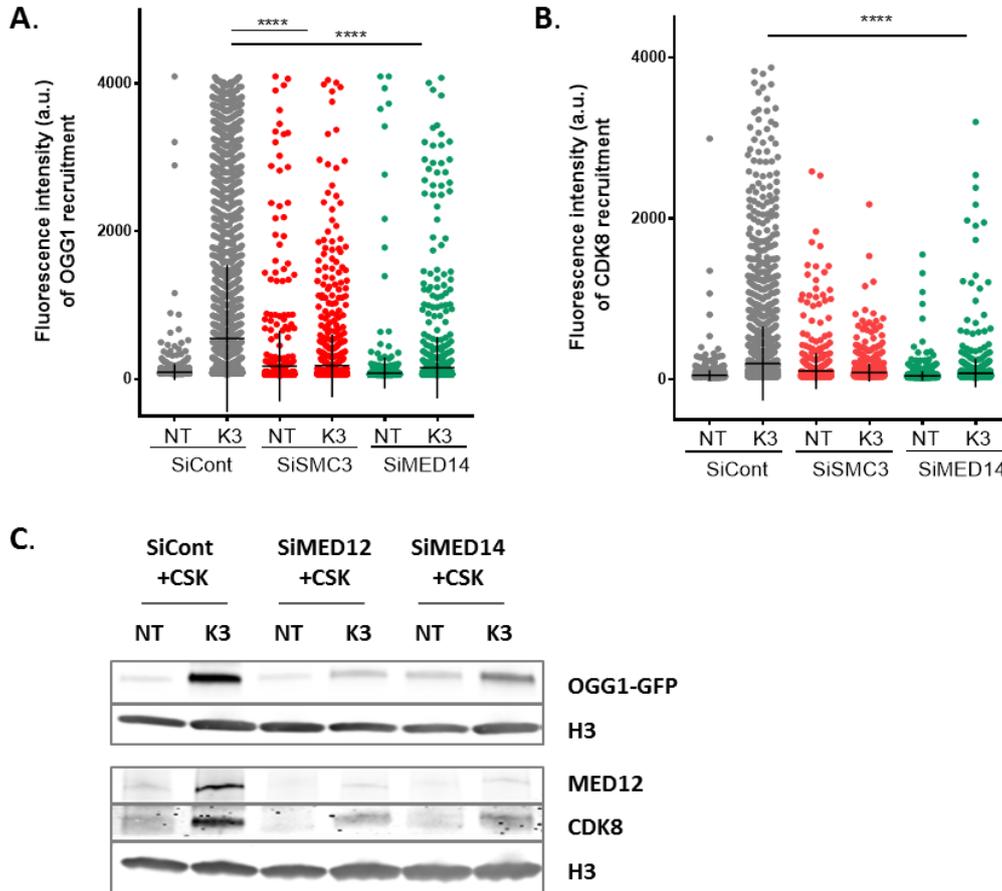


Figure 14 : Le recrutement de MED12 et CDK8 sur la fraction chromatinienne induit par le stress oxydant est dépendant du corps du Médiateur et des cohésines. Quantification des intensités de fluorescence d'OGG1 (A) et de CDK8 (B) avant (NT) et après traitement (K3) par KBrO_3 sur la fraction chromatinienne (+CSK) dans des cellules transfectées par un siCont ou un siRNA contre les sous-unités MED12 et MED14. Les protéines de fusion OGG1-mCherry et CDK8-GFP ont été co-transfectées dans des cellules Hela le jour précédent les traitements et la fixation. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer la condition SiCont+K3 aux conditions SiSMC3/MED14+K3. Pour chaque condition $n > 900$ cellules ; (****) $P < 0.0001$. C. Analyse d'OGG1, MED12 et CDK8 par western blot dans les mêmes conditions de traitement que décrit ci-dessus. Des cellules OGG1-GFP ont été transfectées par un siCont ou un siRNA contre MED12 et MED14. Un anticorps contre H3 a été utilisé comme contrôle de charge.

4. Association d'OGG1 avec les complexes Médiateur et cohésines induite par le stress oxydatif

La microscopie confocale nous a renseignés sur la localisation sub-nucléaire d'OGG1, du Médiateur et des cohésines, en condition de stress oxydatif ou non. Afin d'étudier plus précisément la relation entre ces différentes protéines, particulièrement après stress, nous avons utilisé une approche par co-immunoprécipitation. Une immunoprécipitation contre la sous-unité SMC1 dans des cellules Hela OGG1-GFP nous a permis d'observer une association entre les cohésines et OGG1, exclusivement après traitement par KBrO₃ (Figure 15A). Cette association uniquement après stress a également été retrouvée entre OGG1 et trois sous-unités du module CDK : CDK8, MED12 et MED13 (Figure 15B, C et D). Ces résultats révèlent une association spécifique d'OGG1 avec les complexes Médiateur et cohésines, induite par un stress oxydatif. Comme vu précédemment, OGG1 et MED12 sont toutes deux co-recrutées et co-localisées sur la chromatine après traitement par KBrO₃. Cette association entre MED12 et OGG1 après stress a-t-elle lieu dans la fraction soluble ou insoluble du noyau ? Pour répondre à cette question, les fractions totales (T), solubles (S1) et insolubles (P1) ont été isolées par un fractionnement subcellulaire, et une immunoprécipitation contre MED12 a été réalisée dans chaque fraction. Nous avons pu observer une association majoritaire entre MED12 et OGG1 dans la fraction insoluble après traitement par KBrO₃ (Figure 15E). Cette observation suggère que MED12 et OGG1 s'associent lorsqu'elles sont co-recrutées sur la chromatine après stress et qu'elles ne font pas partie du même complexe dans la fraction soluble.

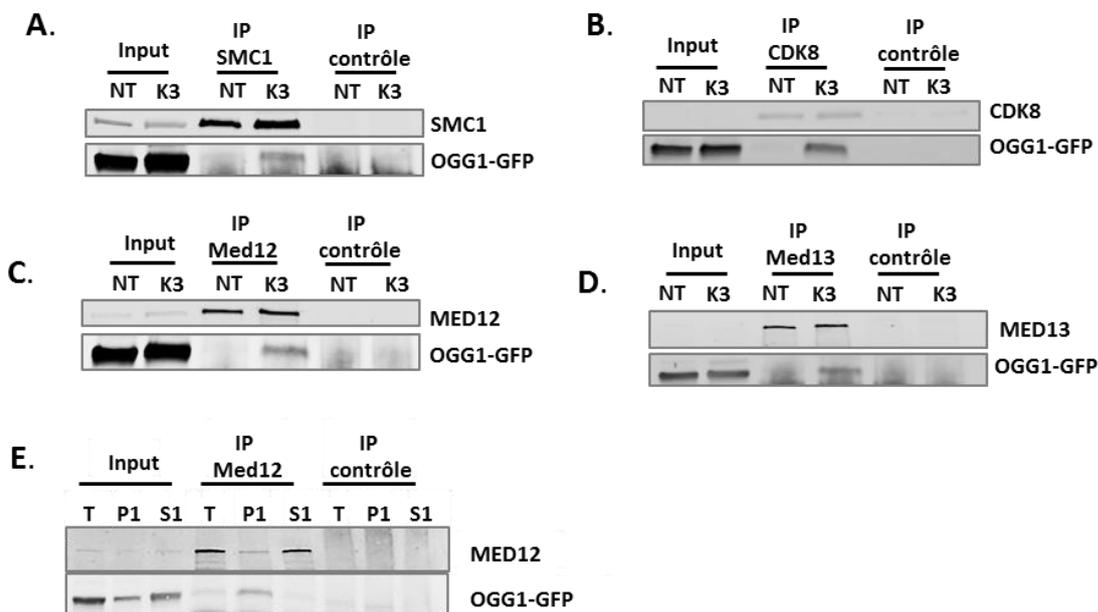


Figure 15 : OGG1, le Médiateur et les cohésines s'associent après un stress oxydatif. Immunoprécipitation des protéines SMC1 (A), CDK8 (B), MED12 (C) et MED13 (D) dans des cellules Hela OGG1-GFP non traitées (NT) et traitées (K3) par KBrO₃. Des immunoprécipitations avec des IgG non spécifiques ont été utilisées comme contrôle. Les fractions protéiques totales (input) ou immunoprécipitées (IP) ont été analysés par western blot en utilisant des anticorps spécifiques contre chacune de ces protéines ainsi qu'OGG1. E. Après fractionnement subcellulaire de cellules Hela OGG1-GFP traitées par KBrO₃ permettant d'isoler les fractions totales (T), solubles (S1) et insolubles (P1), une

immunoprécipitation contre MED12 a été réalisée dans chacune des fractions, suivie par un western blot contre MED12 et OGG1.

La technique de co-immunoprécipitation ne nous permet cependant pas de savoir si OGG1 interagit directement ou non avec les différents complexes. Afin d'obtenir plus de détails sur la proximité de ces protéines, nous avons choisi d'utiliser une approche par FLIM-FRET. La technique de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) peut normalement être utilisée pour détecter les interactions protéines-protéines dans des cellules vivantes ou fixées. Cette technique est basée sur le transfert d'énergie entre deux fluorophores, du donneur excité vers l'accepteur. Le transfert d'énergie nécessite alors que les deux fluorophores soient dans une proximité maximum de 10 nm (De Los Santos et al., 2015). Des cellules Hela ont été transfectées par un plasmide CDK8-GFP seul, ou par une combinaison de plasmides CDK8-GFP (le donneur) et OGG1-Halotag (l'accepteur). La demi-vie de fluorescence du fluorophore donneur a été mesurée. Cette demi-vie est mesurée par « Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy » (FLIM) (Lières et al., 2007), et est définie comme le laps de temps entre l'excitation du fluorophore et l'émission de photons. Si un fluorophore accepteur se trouve à une proximité de moins de 10 nm du fluorophore donneur, la demi-vie de fluorescence se voit alors diminuée suite à un transfert d'énergie vers l'accepteur.

Nous avons dans un premier temps suivi la demi-vie de fluorescence du donneur seul (CDK8-GFP) dans des cellules non traitées (NT) ou traitées par KBrO_3 (K3, plus ou moins CSK). Aucune différence significative n'a été observée entre les demi-vies de fluorescence de la GFP dans ces trois conditions, avec une moyenne autour de 2.3 ns (Figure 16A et B, trois premières conditions). Cette moyenne correspond à la demi-vie bien caractérisée de la GFP (Pepperkok et al., 1999). Lorsque l'accepteur est ajouté (OGG1-Halotag), aucune différence significative n'a été observée dans les cellules non traitées, en comparaison des cellules non traitées exprimant le donneur seul (Figure 16A et B, quatrième condition). Dans des cellules traitées (K3) une diminution de la demi-vie de fluorescence (2.14 ns) a été observée dans les cellules exprimant le donneur et l'accepteur, en comparaison des cellules non traitées possédant également les deux fluorophores (Figure 16B, cinquième condition). L'utilisation d'un code couleurs pour exprimer la demi-vie du donneur permet de visualiser l'apparition de spots bleus dans le noyau qui indique une diminution de la demi-vie, et donc une proximité des deux fluorophores, plus importante dans ces régions (Figure 16A, cinquième condition, spots bleus indiqués par des flèches). Enfin la demi-vie de fluorescence du donneur est significativement diminuée dans des cellules lavées au CSK et traitées par KBrO_3 (2.04 ns) par rapport à la condition non traitée (2.3 ns), lorsque les cellules possèdent le donneur et l'accepteur (Figure 16B, sixième condition). Une fois de plus cette diminution est traduite par l'apparition de larges spots bleus dans l'ensemble du noyau (Figure 16A, sixième condition, spots bleus indiqués par des flèches). Ces résultats traduisent une forte proximité (<10 nm) des protéines OGG1 et CDK8 après traitement par KBrO_3 , une fois qu'elles sont recrutées sur la chromatine. Les résultats présentés ici avec le couple CDK8-GFP/OGG1-Halotag ont de plus été retrouvés avec le couple CDK8-GFP/OGG1-mCherry, confirmant nos observations avec deux fluorophores accepteurs différents. La cinétique de décroissance de la demi-vie du donneur (CDK8-GFP) +/- l'accepteur (OGG1-mCherry) a été comparée dans deux cellules traitées par KBrO_3 et lavées

par le tampon CSK (Figure 16C). La superposition de ces deux courbes illustre la décroissance plus rapide de la demi-vie de fluorescence du donneur en présence de l'accepteur.

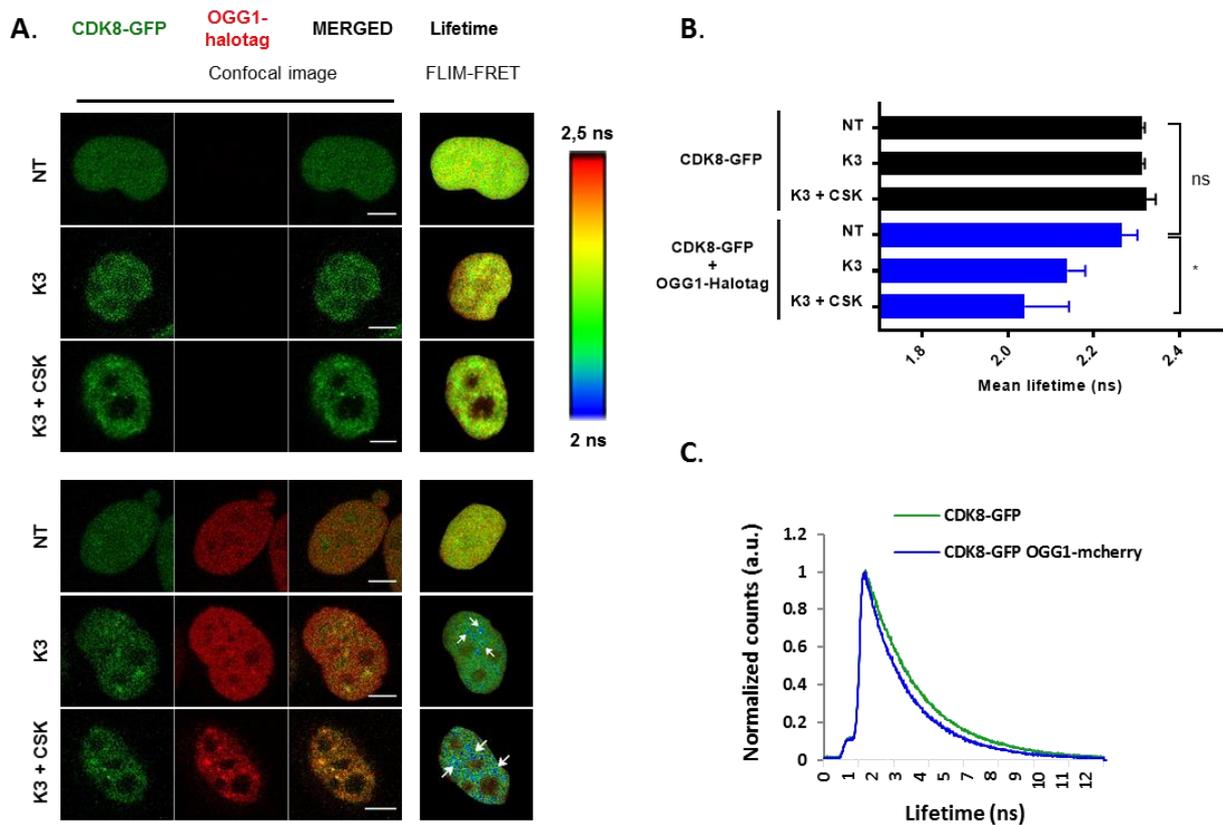


Figure 16 : Proximité sub-nucléaire entre OGG1 et CDK8 après leur relocalisation sur la chromatine induite par un stress oxydatif. A. Distribution intracellulaire des protéines OGG1-Halotag et CDK8-GFP avant traitement (NT) ou après traitement (K3+/-CSK) dans des cellules HeLa. Echelle : 5 µm. La demi-vie de fluorescence du donneur (CDK8-GFP) est représentée par une échelle de pseudo-couleurs allant de 2 à 2.5 ns et présentée à droite des images. **B.** Quantification des demi-vies de fluorescence dans chaque condition. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les différentes conditions. Pour chaque condition $n \approx 12$ cellules ; (*) $P < 0.05$. **C.** Cinétiques de décroissances de la demi-vie de fluorescence de la GFP dans deux cellules traitées par K3+CSK : l'une contient le donneur seul (CDK8-GFP), l'autre possède le donneur (CDK8-GFP) et l'accepteur (OGG1-mCherry).

5. Rôle et dynamique des sous-unités paralogues du module CDK du Médiateur

Nous avons vu précédemment que le recrutement d'OGG1 sur la chromatine était plus ou moins dépendant des sous-unités du module CDK du Médiateur (Figure 3). Or trois sous-unités sur quatre possèdent des protéines paralogues : MED12L, MED13L et CDK19 sont les paralogues respectifs de MED12, MED13 et CDK8. De plus, il semble que ces sous-unités soient mutuellement exclusives : MED12 et MED12L ne peuvent coexister dans un même complexe du Médiateur, de même pour les sous-unités MED13 et MED13L, ou CDK8 et CDK19 (Daniels et al., 2013). Le rôle de ces sous-unités paralogues sur le recrutement d'OGG1

a donc été testé grâce à l'utilisation de siRNAs. L'efficacité et la spécificité des siRNAs ont tout d'abord été vérifiées par western blot (Figure 17A). Pour chaque couple de sous-unités (paralogue/non paralogue) l'effet des siRNAs ont été testés séparément puis couplés : par exemple le siRNA contre MED12 seul, celui contre MED12L seul, puis un mélange de siRNAs contre MED12 et MED12L. L'intensité de fluorescence de la fraction OGG1-GFP retenue sur la chromatine (+CSK) a été comparée pour chaque siRNA entre des cellules non traitées (NT) et traitées (K3) par KBrO₃. Les intensités de fluorescence ont été normalisées par la moyenne de l'intensité de fluorescence d'OGG1-GFP dans la condition « siCont+CSK » dans chaque expérience afin de pouvoir comparer les effets observés. Cette analyse a révélé une diminution significative du recrutement d'OGG1 sur la chromatine en présence des différents siRNAs, seuls ou couplés, en comparaison des cellules transfectées par le siCont (Figure 17B, C et D). Ces résultats mettent en avant la nécessité des sous-unités MED12, MED12L, MED13, MED13L, CDK8 et CDK19 pour retenir OGG1 sur la chromatine après un stress oxydatif. On peut cependant noter un effet supérieur des siRNAs contre MED12, MED12L, MED13 et MED13L en comparaison des siRNAs contre CDK8 et CDK19, avec des moyennes normalisées d'intensité de fluorescence d'OGG1 de 0.52, 0.49, 0.38, 0.44, contre 0.65 et 0.94 respectivement (la moyenne normalisée étant de 1 dans la condition contrôle).

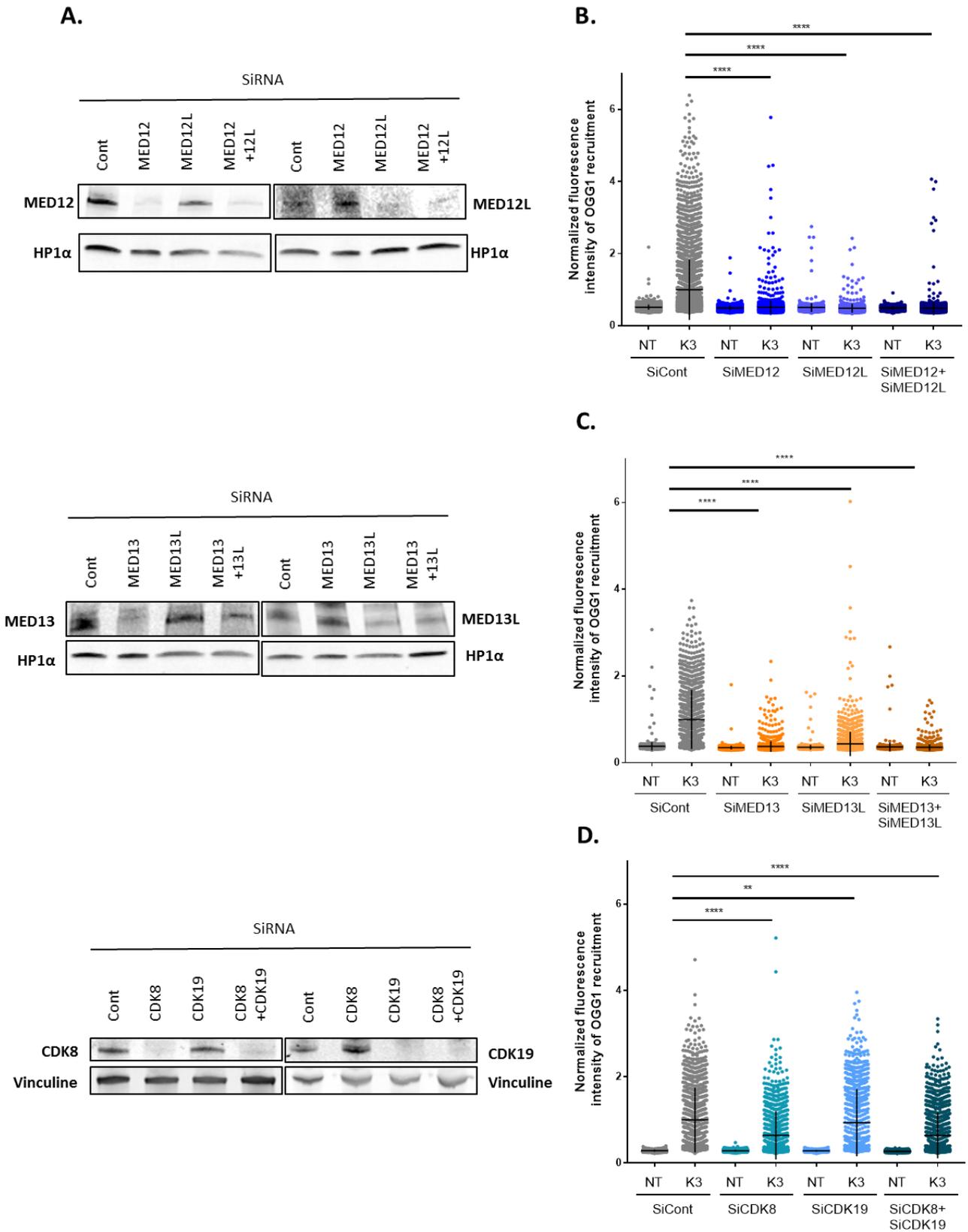


Figure 17 : La relocalisation d’OGG1 sur la chromatine dépend des sous-unités paralogues du module CDK. A. L’efficacité et la spécificité des siRNAs contre MED12, MED12L, MED13, MED13L, CDK8 et CDK19 a été vérifiée par western blot. Un anticorps contre HP1α a été utilisé

comme contrôle de charge. **(B, C et D)** Quantification des intensités de fluorescence d'OGG1 avant (NT) et après traitement (K3) par KBrO_3 sur la fraction chromatinienne (+CSK) dans des cellules Hela OGG1-GFP transfectées par un siCont ou par un siRNA contre les sous-unités MED12 et/ou MED12L **(B)**, MED13 et/ou MED13L **(C)**, CDK8 et/ou CDK19 **(D)**. Les intensités ont été normalisées par la moyenne obtenue dans la condition siCont+K3 dans chaque expérience. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les différentes conditions. Pour chaque condition $n > 800$ cellules ; (**) $P < 0.001$; (****) $P < 0.0001$.

Nous avons mis en évidence que deux sous-unités du module CDK sont co-recrutées et co-localisent avec OGG1 sur la chromatine après traitement par KBrO_3 : CDK8 et MED12 (Figures 11 et 12). La dynamique de leurs sous-unités paralogues respectives CDK19 et MED12L a donc également été étudiée par microscopie. Des cellules Hela ont été co-transfectées avec des plasmides OGG1-GFP/CDK19-Halotag ou OGG1-GFP/MED12L-Halotag afin de suivre la localisation subcellulaire de ces différentes protéines. La distribution globale (-CSK) et chromatinienne (+CSK) dans des cellules non traitées (NT) et traitées (K3) par KBrO_3 ont été comparées. La visualisation des cellules par microscopie a permis de mettre en évidence plusieurs paramètres : **1)** CDK19 et MED12L, tout comme OGG1, ne sont pas retenues sur la chromatine avant traitement (Figure 18A et B, condition NT+CSK) ; **2)** CDK19 et MED12L sont recrutées sur la chromatine après traitement par KBrO_3 (Figure 18A et B, condition K3+CSK) ; **3)** l'analyse des coefficients de Pearson a de plus révélé une bonne co-localisation d'OGG1 avec CDK19 et MED12L suite à leur co-recrutement sur la chromatine (coefficients de Pearson de 0.96 et 0.93 respectivement).

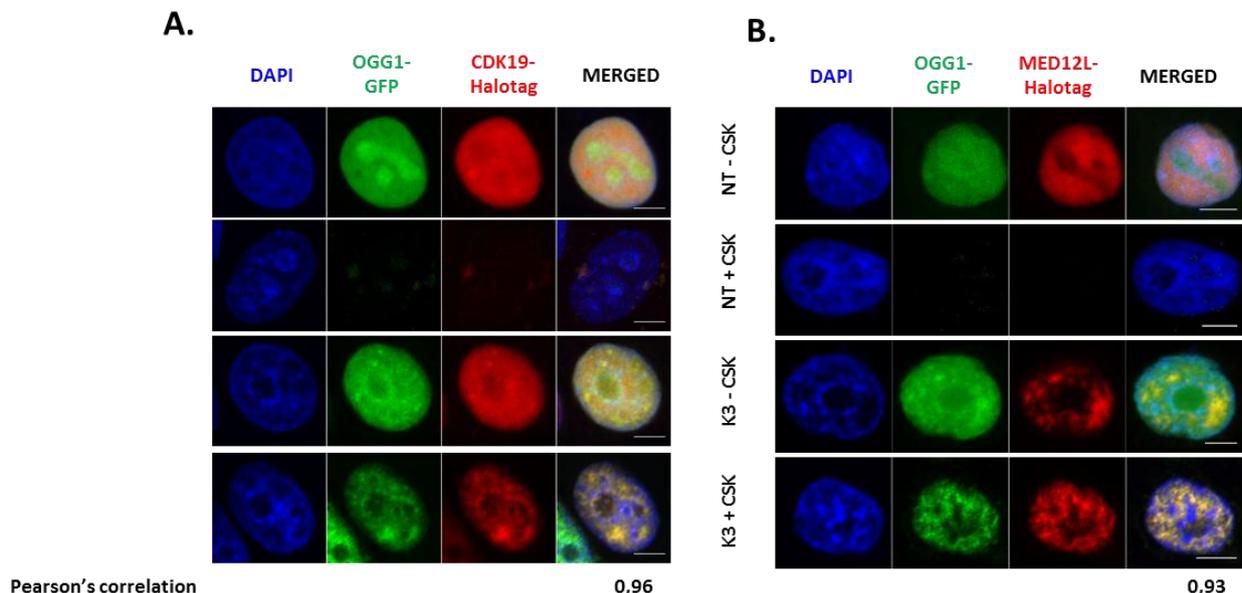


Figure 18 : CDK19 et MED12L sont co-recrutées et co-localisées avec OGG1 sur la chromatine après stress oxydatif. Distributions intracellulaires des protéines de fusion OGG1-GFP/CDK19-Halotag **(A)** et d'OGG1-GFP/MED12L-Halotag **(B)** co-transfectées dans des cellules Hela, avant (NT) et après traitement (K3), dans la fraction totale (-CSK) ou chromatinienne (+CSK) du noyau. Echelle : 5 μm .

6. Rôle de l'activité kinase sur le recrutement d'OGG1/CDK8 et la réparation de la 8-oxoG

Parmi toutes les sous-unités du complexe Médiateur, les seules protéines possédant une activité kinase sont CDK8 et son paralogue CDK19. La sous-unité CDK8 est capable de phosphoryler plusieurs composants de la machinerie transcriptionnelle, tels que l'ARN Pol II, ainsi que certaines sous-unités du Médiateur lui-même, telles que MED12 ou MED13 (Knuesel et al., 2009b). Sachant que CDK8 et CDK19 sont toutes deux co-recrutées avec OGG1 suite à un stress oxydatif, nous avons étudié le rôle de l'activité kinase CDK8/CDK19 sur le recrutement de CDK8 et OGG1 par microscopie. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur sélectif des kinases CDK8/CDK19, la cortistatin A (CA) (Pelish et al., 2015), fournie par le laboratoire d'Henry Pelish (Université de Harvard). Nous avons utilisé l'inhibiteur à la dose recommandée de 100 nM. Des cellules Hela ont été co-transfectées avec des plasmides codant pour CDK8-GFP et OGG1-mcherry, traitées (K3) ou non (NT) par du KBrO₃, puis lavées avec du tampon CSK 3h après le traitement avant d'être fixées. Les mêmes traitements ont été faits en parallèle avec des cellules incubées dans du milieu contenant l'inhibiteur durant toutes les étapes. L'analyse par microscopie d'OGG1 et de CDK8 a révélé des intensités de fluorescence similaires 3h après le traitement, attestant d'un recrutement d'OGG1 et de CDK8 indépendant de l'inhibition de l'activité kinase de CDK8/CDK19 (Figure 19A et B). L'efficacité de l'inhibiteur a également été vérifiée par western blot. Parmi ses nombreux substrats, CDK8 est capable de phosphoryler la sérine 727 du facteur de transcription STAT1 (Bancerek et al., 2013). L'état de phosphorylation de STAT1 a donc été comparé avant et après ajout de l'inhibiteur. La phosphorylation S727 visible en absence de l'inhibiteur s'est révélée fortement réduite après l'ajout de la CA (Figure 19D), confirmant l'efficacité de l'inhibiteur.

La fonction d'OGG1 étant de réparer la lésion 8-oxoG, nous avons également comparé la cinétique de réparation de la lésion en absence et en présence de la CA. Des cellules Hela OGG1-GFP ont été traitées ou non (NT) avec du KBrO₃, puis fixées immédiatement (K0) ou 3h après le traitement (K3). Une fois encore des cellules incubées dans du milieu contenant l'inhibiteur ont été traitées de la même manière en parallèle. L'analyse de l'intensité de fluorescence du marquage anti-8-oxoG n'a pas révélé de différence significative au temps K3, suggérant une réparation de la 8-oxoG indépendante de l'activité kinase CDK8/CDK19 (Figure 19C).

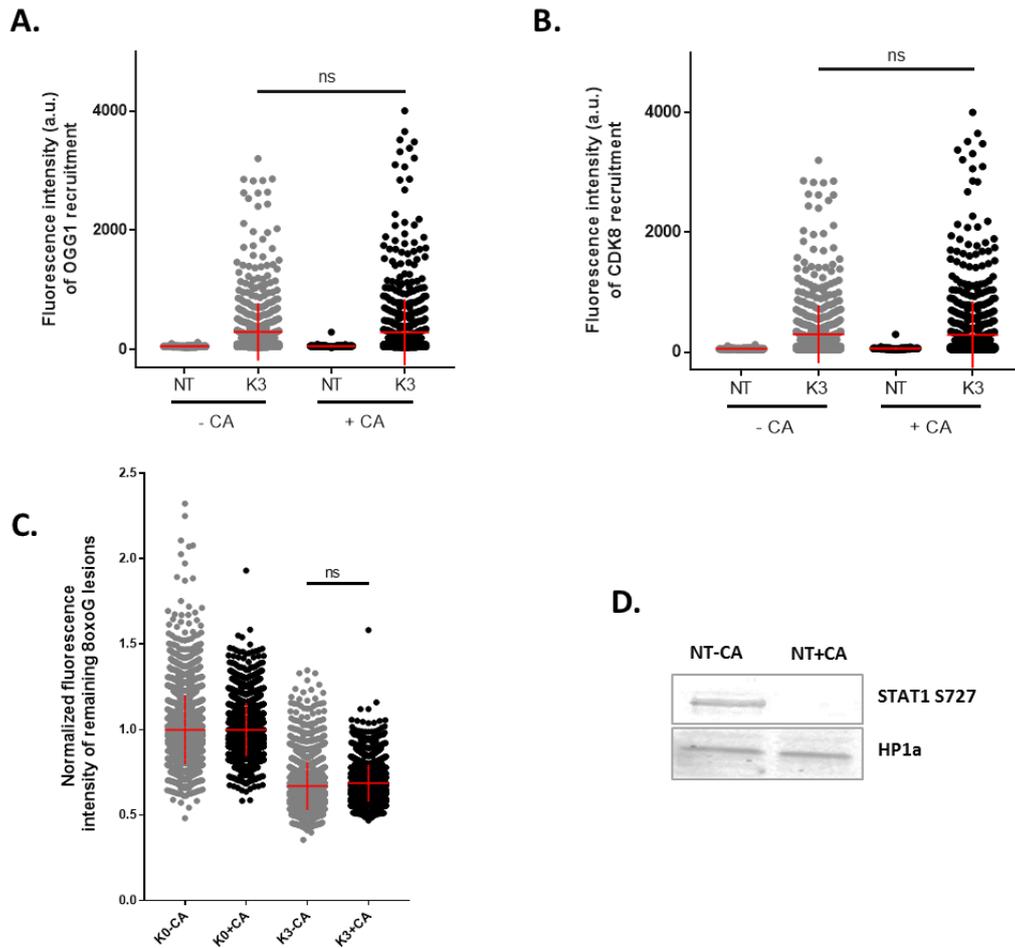


Figure 19 : Le recrutement d’OGG1 sur la chromatine et la réparation de la 8-oxoG ne nécessitent pas l’activité enzymatique des kinases CDK8/CDK19. Quantification des intensités de fluorescence d’OGG1 (A) et de CDK8 (B) avant (NT) et après traitement (K3) par KBrO_3 sur la fraction chromatiniennne (+CSK) en présence (+CA) ou non (-CA) d’un inhibiteur de l’activité kinase de CDK8/CDK19 (CA). Des plasmides codant pour les protéines de fusion OGG1-mCherry et CDK8-GFP ont été co-transfectées dans des cellules Hela le jour précédent les traitements et la fixation. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les conditions avec et sans CA. Pour chaque condition $n > 200$ cellules. C. Intensités de fluorescence des lésions 8-oxoG aux temps K0 et K3, normalisées par l’intensité moyenne obtenue aux temps K0, dans des cellules Hela OGG1-GFP en présence ou non de l’inhibiteur. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les conditions avec et sans CA. Pour chaque condition $n > 1700$ cellules. D. Analyse par western blot de l’état de phosphorylation de la sérine 727 du facteur STAT1 en présence ou non de l’inhibiteur. Un anticorps contre HP1 α a été utilisé comme contrôle de charge.

VII. Résultats complémentaires

1. Dynamique d'OGG1 et de CDK8 après micro-irradiation laser

L'induction de 8oxoG par micro-irradiation laser permettant de suivre le recrutement en temps réel d'OGG1 sur le site de dommage a été précédemment optimisée au laboratoire (Campalans et al., 2013). Dans cette étude, la formation locale de dommages oxydatifs était assurée par l'ajout d'un photo-sensibilisateur, le Ro 19-8022 (Ro), dans le milieu de culture juste avant la micro-irradiation par un laser 405-nm (Will et al., 1999). Ce protocole a donc été repris pour suivre la dynamique d'OGG1 et de CDK8 après micro-irradiation, une des deux protéines du module CDK relocalisées sur la chromatine avec OGG1 après l'induction des 8oxoG par traitement au KBrO_3 . Des cellules Hela ont été co-transfectées par des plasmides codant pour CDK8-GFP et OGG1-mCherry avant d'être micro-irradiées par un laser 405-nm, ces cellules étant incubées dans du milieu contenant ou non le Ro. En présence de Ro un recrutement d'OGG1 et de CDK8 a clairement été observé aux sites de dommages après micro-irradiation (Figure 20A et B, zone irradiée indiquée par une barre jaune). Le microscope utilisé (confocal à balayage laser Nikon A1) ne nous permettait pas de mesurer les intensités de fluorescence pendant le temps de l'irradiation (Figure 20B, rectangle gris). Cependant la mesure des intensités suivant immédiatement ce laps de temps nous a révélé un recrutement de CDK8-GFP sur la zone irradiée qui semblerait survenir plus rapidement que celui d'OGG1-mCherry (Figure 20B). Le recrutement d'OGG1 et de CDK8 n'a pas été détecté dans les mêmes cellules irradiées en absence de Ro (Figure 20C), attestant du recrutement spécifique de ces protéines en présence de dommages oxydatifs induits par le Ro.

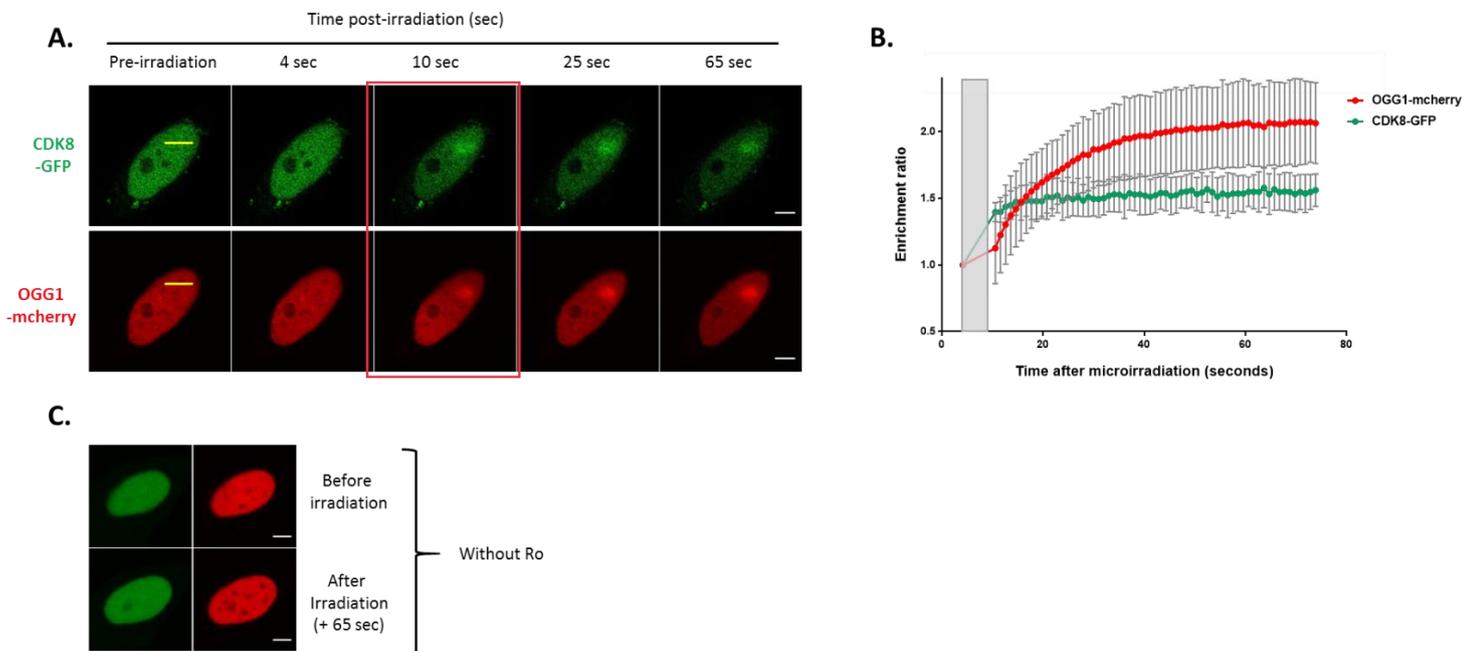


Figure 20 : OGG1 et CDK8 sont recrutées aux dommages oxydatifs induits par micro-irradiation laser. A. Imagerie en temps réel de cellules Hela co-exprimant CDK8-GFP et OGG1-mCherry et micro-irradiées avec un laser 405-nm avec ajout du photo-sensibilisateur Ro 19-8022 (Ro). Les barres jaunes

indiquent le site de micro-irradiation. Echelle : 5 μm . **B.** Quantification de l'enrichissement de l'intensité de fluorescence du signal GFP (488) et mCherry (594) sur la zone micro-irradiée au cours du temps. Représentation : Moyenne avec écart-type **C.** Imagerie en temps réel de cellules Hela co-exprimant CDK8-GFP et OGG1-mCherry sans ajout du photo-sensibilisateur Ro. Echelle : 5 μm .

2. Modification post-traductionnelle des cohésines après induction de dommages oxydatifs

Le point de départ de notre projet était la question suivante : quels sont les signaux capables de déclencher la relocalisation d'OGG1 de la fraction soluble du noyau (nucléoplasme) vers les domaines d'euchromatine après un stress oxydatif ? Les résultats présentés jusqu'ici ont mis en avant un rôle central des complexes Médiateur et cohésines dans la relocalisation d'OGG1 après un stress oxydatif. Cependant, nous ne savons toujours pas à ce stade quel est le (les) signal (signaux) permettant d'induire les changements présentés dans les paragraphes ci-dessus. Or il a été montré que les cohésines sont sujettes à de nombreuses modifications post-traductionnelles, dont certaines sont des événements indispensables dans la réponse aux dommages de l'ADN (Yazdi et al., 2002; Luo et al., 2008). Une hypothèse serait donc que certaines modifications post-traductionnelles puissent favoriser ou déclencher la relocalisation d'OGG1 après stress oxydatif. Parmi ces modifications, la phosphorylation de la sous-unité SMC1 sur le résidu sérine 966 (S966) est connue pour être induite en réponse aux irradiations ionisantes (Yazdi et al., 2002). Nous avons donc suivi l'état de phosphorylation de cette sérine en fonction du traitement par KBrO_3 (cellules NT comparées aux cellules K3), dans l'ensemble du noyau (-CSK) et dans la fraction chromatinienne (+CSK) dans des cellules Hela OGG1-GFP. L'état de phosphorylation a tout d'abord été détecté par western blot grâce à un anticorps anti-SMC1 phospho-S966. Ce marquage a mis en évidence une phosphorylation de SMC1 en S966 majoritairement dans les cellules traitées (K3), que ce soit dans l'ensemble du noyau ou sur la fraction chromatinienne (Figure 21A). Les niveaux de SMC1 ont été comparés par un marquage anti-SMC1, confirmant la présence de la protéine dans des proportions similaires dans les quatre conditions (Figure 21A). Ces résultats ont été confirmés par microcopie grâce au même anticorps anti-SMC1 phospho-S966 : la phosphorylation est principalement détectée dans les conditions traitées, avec et sans CSK (Figure 21B). La microscopie nous a également permis de suivre la localisation de cette phosphorylation par rapport à celle d'OGG1, particulièrement dans la condition « K3+CSK », et nous avons observé une très faible corrélation entre les deux signaux (Figure 21B). Ces résultats montrent donc une phosphorylation de la sérine 966 de SMC1 après traitement par KBrO_3 . Cependant rien ne nous permet pour le moment de lier directement cette phosphorylation au recrutement d'OGG1 sur la chromatine.

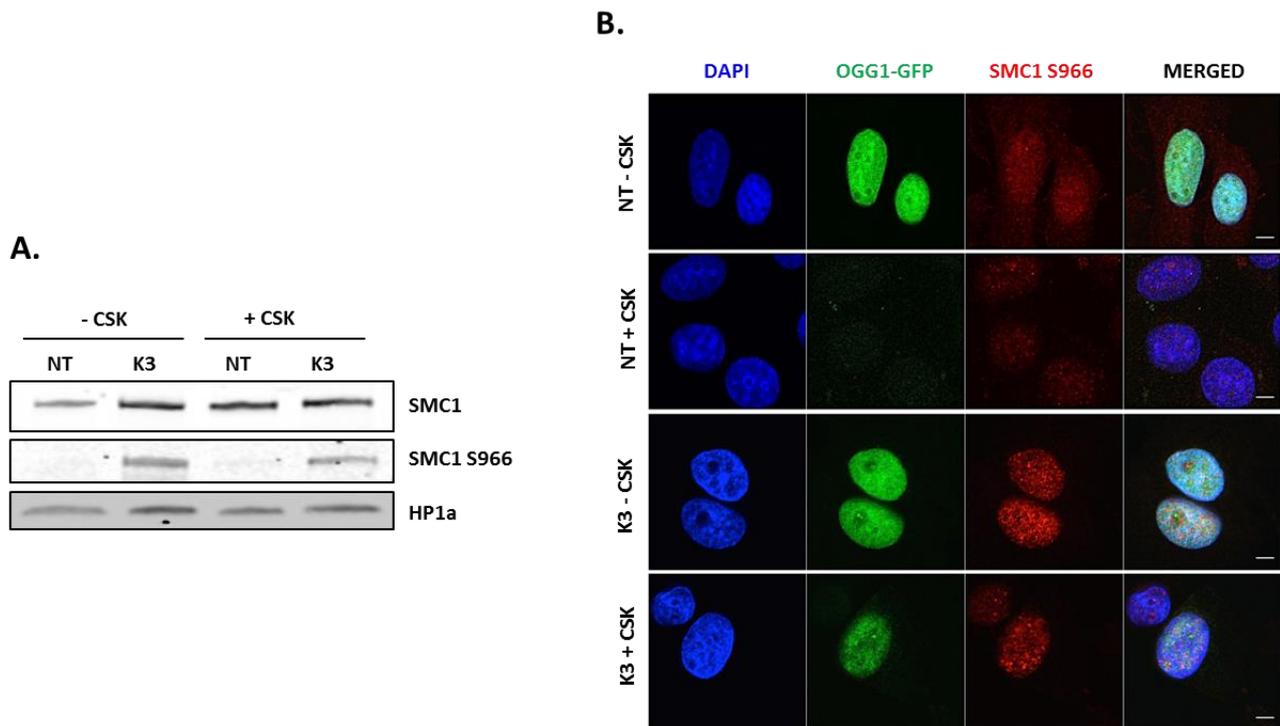


Figure 21 : Le traitement par KBrO_3 induit une phosphorylation de la sérine 966 de la sous-unité SMC1 des cohésines. **A.** Fractionnement subcellulaire de cellules Hela OGG1-GFP non traitées (NT) et traitées (K3) par KBrO_3 . Les fractions totales (-CSK) et insolubles (+CSK) ont été analysées par western blot grâce à l'utilisation d'anticorps contre SMC1 et sa forme phosphorylée en S966. Un anticorps contre HP1 α a été utilisé comme contrôle de charge. **B.** Distributions intracellulaires d'OGG1-GFP et de la forme phosphorylée de SMC1 en position S966 dans les mêmes conditions. Une immunofluorescence contre la forme phosphorylée a été effectuée avant de marquer les noyaux au DAPI. Echelle : 5 μm .

3. Suivi de la transcription globale après exposition au stress oxydatif

Il a précédemment été montré qu'OGG1 était relocalisée dans les domaines d'euchromatine du noyau, riches en ARNm et en ARN Pol II (Amouroux et al., 2010). Nous savons également que la 8-oxoG n'est pas considérée comme une lésion bloquante pour la transcription (Charlet-Berguerand et al., 2006). Cependant, cela ne signifie pas nécessairement que la transcription ne soit pas impactée par la présence physique de la machinerie du BER, dont OGG1, sur l'ADN. Autrement dit, comment la transcription et la réparation par le BER sont-elles coordonnées sur l'ADN lorsque des lésions doivent être réparées ? Pour répondre à cette question, la transcription globale a été suivie dans des cellules Hela OGG1-GFP grâce à l'incorporation de EU (5-ethynyl-uridine), un analogue de l'uridine, juste avant la fixation de cellules non traitées (NT) ou traitées par KBrO_3 et fixées 0, 3 ou 6 heures post-traitement (K0, K3 et K6). Le recrutement d'OGG1 a également été suivi en parallèle, toujours dans des cellules Hela OGG1-GFP, aux mêmes temps que ceux utilisés pour suivre l'incorporation du EU. Ces cellules ont été lavées au CSK afin de visualiser la fraction d'OGG1-GFP relocalisée sur la

chromatine avant d'être fixées. L'analyse par microscopie nous a permis d'observer le recrutement progressif d'OGG1 sur la chromatine, induit par le traitement par KBrO_3 (Figure 22A). Ce recrutement d'OGG1 était de plus corrélé à une diminution progressive du marquage EU au cours du temps (Figure 22B). La quantification des intensités de fluorescence de la GFP (488) et du marquage EU (594) a confirmé ces observations (Figure 22C). Ces résultats nous indiquent donc que le traitement par KBrO_3 est associé à une relocalisation d'OGG1 sur la chromatine et à une diminution globale de la transcription. Cependant, aucun élément ne nous permet pour le moment de relier directement ces deux événements.

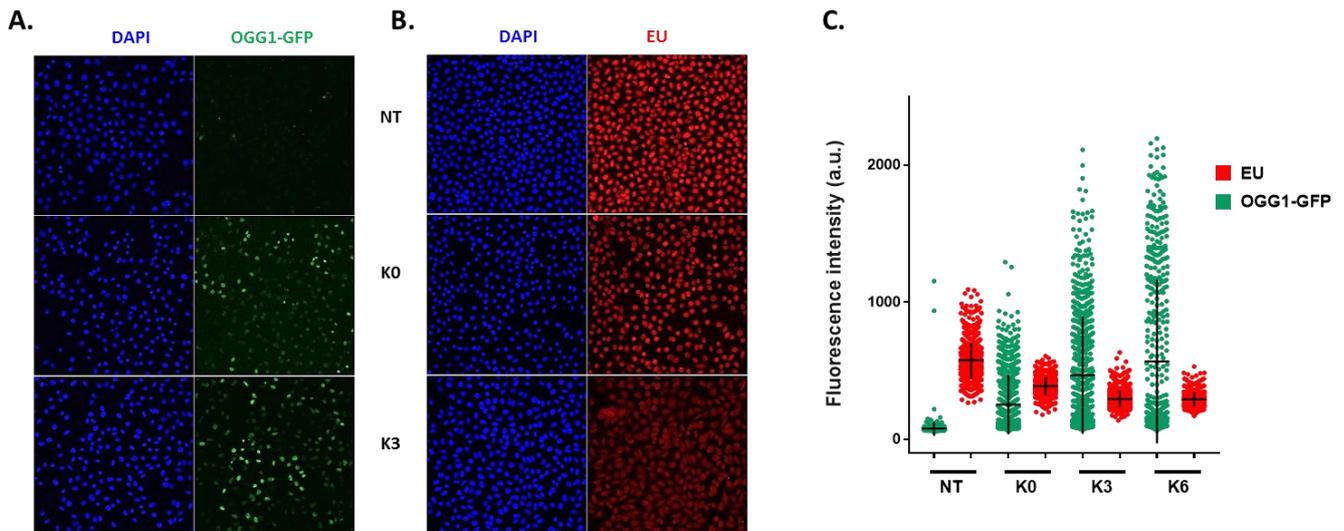


Figure 22 : Le recrutement d'OGG1 sur la chromatine est corrélé à une diminution globale de la transcription. **A.** Relocalisation d'OGG1 sur la chromatine (+CSK) dans des cellules HeLa OGG1-GFP traitées ou non par KBrO_3 et fixées 0 (K0) et 3 heures (K3) post-traitement. **B.** Marquage du EU incorporé dans des cellules HeLa OGG1-GFP traitées dans les mêmes conditions, sans CSK. **C.** Quantification des intensités de fluorescence de la GFP et du EU dans des cellules HeLa OGG1-GFP non traitées (NT) ou traitées par KBrO_3 et fixées aux temps K0, K3 et K6 post-traitement. Pour chaque condition, $n > 500$ cellules.

4. Recherche de nouveaux acteurs impliqués dans le recrutement d'OGG1

Afin de rechercher de nouveaux acteurs impliqués dans la relocalisation d'OGG1 suite à un stress oxydatif, nous avons choisi une approche par la technique récemment développée sous le nom de BioID (Biotin Identification). Cette technique utilise une enzyme biotine ligase modifiée (BirA*) fusionnée à une protéine d'intérêt (OGG1 dans notre cas), capable de marquer de façon covalente par l'ajout de biotine toute protéine se trouvant à proximité de la protéine d'intérêt (environ 10 nm) (Kim and Roux, 2016). Cette méthode permet donc la biotinylation des protéines proches d'OGG1, qui peuvent ensuite être purifiées grâce à l'affinité de la biotine pour la streptavidine.

Des cellules HeLa ont été transfectées par des plasmides codant pour les protéines de fusion OGG1-BirA-NLS ou BirA-NLS. La comparaison entre ces deux formes de plasmides était indispensable pour discriminer les protéines biotinylées spécifiquement grâce à la présence

d'OGG1, et non du fait de la présence de la protéine BirA surexprimée. Le lendemain, les cellules ont été traitées (K5) ou non (NT) par du KBrO_3 . Le traitement a ensuite été remplacé par du milieu de culture contenant de la biotine à la concentration finale de 50 μM pendant 5h. Des contrôles préliminaires ont été effectués afin de s'assurer de la réponse spécifique des protéines en présence de biotine ou non. Ces contrôles (par microscopie et par biochimie) ont confirmé la détection des protéines par de la streptavidine (anticorps anti-streptavidine ou billes couplées à de la streptavidine) uniquement après l'ajout de biotine. Cinq heures après la fin du traitement, les cellules ont finalement été lysées et une purification des protéines biotinyllées a été réalisée grâce à des billes couplées à de la streptavidine. Les fractions éluées de chaque condition (OGG1-BirA-NLS vs BirA-NLS, NT vs K5 pour chacun) ont enfin été envoyées pour une analyse par spectrométrie de masse prise en charge par le laboratoire de Jean Armengaud (CEA de Marcoule). L'analyse des quatre échantillons a permis d'identifier 746 protéines, certifiées par la présence d'au moins deux peptides de séquences différentes. Afin de mieux apprécier les protéines spécifiquement présentes dans la condition « OGG1-BirA-NLS K5 » par rapport à la condition « OGG1-BirA-NLS NT », l'analyse suivante a été effectuée : les peptides retrouvés avec la forme BirA-NLS seule ont été soustraits à la forme équivalente OGG1-BirA-NLS. C'est-à-dire : (OGG1-BirA-NLS K5) – (BirA-NLS K5), ainsi que (OGG1-BirA-NLS NT) – (BirA-NLS NT). Le résultat obtenu dans les cellules NT a ensuite été soustrait des cellules traitées. A partir de cette dernière opération, les protéines représentées par au moins 3 peptides ont été sélectionnées, nous fournissant ainsi une liste de 106 protéines. La liste de ces protéines, ainsi que le nombre de peptides identifiés à l'origine dans chaque condition, sont présentés en annexe 1. La liste des 20 premières protéines est donnée à titre d'exemple en figure 23A. On remarque que la troisième protéine identifiée est OGG1, attestant de l'efficacité de la technique. Des partenaires connus d'OGG1, tels que SIRT1 (Kang et al., 2015) et PARP1 (Noren Hooten et al., 2011), ont également été identifiés.

Grâce au logiciel Pantherdb, les 106 protéines ont été classées en fonction de leur fonction moléculaire (Figure 23B) et du processus biologique dans lequel elles interviennent (Figure 23C). Ce classement a révélé de nombreuses protéines possédant une fonction de liaison (liaison à la chromatine, liaison à des acides nucléiques etc.) et/ou une activité catalytique (hélicases, hydrolases, lyases etc.), ces protéines étant majoritairement impliquées dans des processus cellulaires tels que la transcription, la réparation ou la signalisation cellulaire. Ces résultats nous ont paru cohérents compte tenu de la fonction et de la localisation nucléaire d'OGG1. Afin de mieux interpréter ces résultats, une analyse bio-informatique pourrait être nécessaire, permettant de mettre en lien les différentes protéines identifiées. De plus, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, nécessitant donc d'être reproduite dans le futur pour confirmer ces résultats.

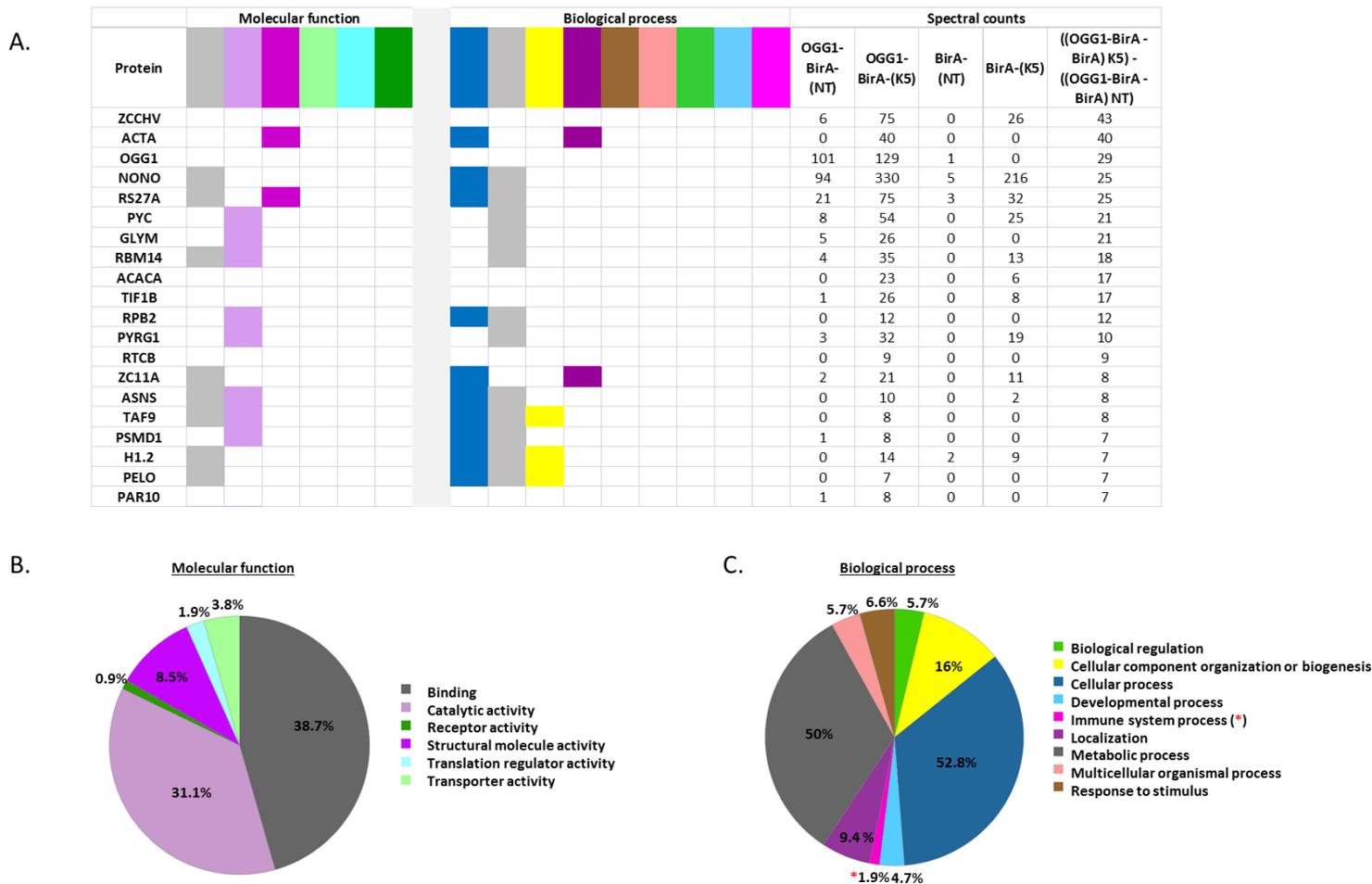
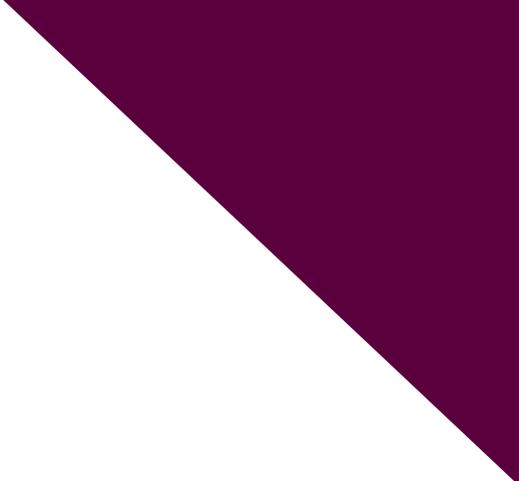


Figure 23 : Partenaires d'OGG1 identifiés par la technique de BioID. A. Tableau présentant les 20 protéines les plus biotinylées par la protéine de fusion OGG1-BirA-NLS dans des cellules traitées au $KBrO_3$, en comparaison des mêmes cellules non traitées. Le nombre de peptides retrouvés par spectrométrie de masse dans chaque condition (cellules Hela transfectées par les plasmides OGG1-BirA-NLS vs BirA-NLS, traitées ou non par $KBrO_3$) est donné pour chaque protéine. La dernière colonne correspond à l'analyse décrite dans le texte ci-dessus. Les 106 protéines représentées par au moins 3 peptides avec cette même analyse ont été classées par fonction moléculaire (**B**) et par le processus biologique dans lequel elles interviennent (**C**). Le code couleur attribué à chaque fonction/processus biologique est repris dans le tableau (**A**) pour les 20 protéines présentées.



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La stabilité de notre génome est continuellement menacée par des attaques endogènes et exogènes, capables d'engendrer différents types de dommages tels que des cassures de l'ADN, des sites abasiques ou encore une oxydation des bases de l'ADN. Pour faire face aux dommages produits par le stress oxydatif la cellule possède une voie majeure de réparation, la réparation par excision de base (BER), conservée des bactéries aux cellules humaines. Le BER a été l'objet d'intenses recherches au sein de notre laboratoire durant ces dernières décennies. Il a ainsi été montré que des « usines de réparation BER » se forment suite à des traitements spécifiques générant des bases oxydées dans l'ADN cellulaire. Notre laboratoire a cherché à comprendre comment les différentes enzymes du BER étaient capables de reconnaître la lésion, de s'assembler et de se coordonner suite à la production de dommages oxydatifs. Dans le cas de la lésion mutagène 8-oxoG l'assemblage du complexe BER dépend du recrutement sur la chromatine d'OGG1, l'ADN glycosylase qui reconnaît et excise spécifiquement cette lésion. Il a été montré qu'OGG1 était relocalisée sur la chromatine après un traitement par bromate de potassium (KBrO₃) (Amouroux et al., 2010), traitement induisant majoritairement des lésions 8-oxoG (Ballmaier and Epe, 2006). Cependant, le recrutement de cette protéine initiatrice ne nécessite pas la reconnaissance de la lésion puisqu'une forme mutante d'OGG1 (F319A) ayant perdue l'affinité pour son substrat, la 8-oxoG, est toujours capable d'être relocalisée sur la chromatine après un traitement par KBrO₃ (Amouroux et al., 2010). Le recrutement d'OGG1 étant indépendant de sa liaison avec la base oxydée, quels sont alors les facteurs ou les signaux permettant de déclencher la relocalisation du BER, dont OGG1, de la fraction soluble vers la fraction insoluble du noyau ? Cette question était le point de départ de ce projet de recherche.

Afin de répondre à cette question, un crible à haut débit a été réalisé en collaboration avec la plateforme PARI du CEA de Saclay. Ce crible a permis d'identifier 168 gènes dont l'inactivation modifiaient la relocalisation d'OGG1 suite à un traitement par KBrO₃, soit en augmentant soit en diminuant son recrutement. Nos études se sont concentrées sur les gènes dont l'inactivation est associée à une diminution du recrutement d'OGG1 à la chromatine, et particulièrement sur deux groupes de protéines : des sous-unités du complexe du Médiateur de la transcription (MED12, MED14 et MED24) et des sous-unités du complexe cohésines (SMC1, SMC3 et RAD21). L'objectif de mon projet de thèse était donc d'étudier plus précisément le rôle de ces complexes dans la réparation de la 8-oxoG par le BER, et plus spécifiquement leur rôle sur vis-à-vis d'OGG1. Nos résultats ont tout d'abord permis d'identifier un certain nombre de protéines essentielles au recrutement d'OGG1 : les trois protéines formant l'anneau de cohésines (SMC1, SMC3 et RAD21), et plusieurs sous-unités du Médiateur dont MED14, située au cœur du Médiateur. Les quatre sous-unités composant le module CDK sont également plus ou moins nécessaires à la relocalisation d'OGG1 (l'inactivation de MED12 et MED13 affecte particulièrement cette relocalisation). Nous avons également été en mesure de montrer que ces protéines sont essentielles au recrutement d'OGG1 indépendamment du cycle cellulaire, et que leur rôle est lié à la fonction intrinsèque d'OGG1, c'est-à-dire la réparation de la lésion 8-oxoG, sans pour autant impacter directement son activité enzymatique. Nos études ont de plus mis en avant une dynamique bien particulière des complexes Médiateur et cohésines en fonction du stress. En effet le corps du Médiateur (modules de la tête, du centre et de la queue) ainsi que les cohésines sont présents sur la fraction chromatinienne indépendamment d'un traitement oxydatif. Ceci s'avère également vrai pour deux sous-unités du module CDK, les sous-unités MED13 et la CyC, tandis que les sous-unités

MED12 et CDK8 sont recrutées comme OGG1 après un traitement par KBrO_3 . Le recrutement de MED12 et CDK8 s'avère de plus spécifique des domaines d'euchromatine et dépendant du corps du Médiateur et des cohésines. Grâce aux analyses par microscopie confocale, nous avons été en mesure d'observer une très bonne co-localisation d'OGG1, de MED12 et de CDK8 suite à leur recrutement sur la chromatine. Cependant, comment savoir si ces complexes opèrent réellement dans des zones similaires du génome ? Nos expériences de co-immunoprécipitation ont confirmé l'association d'OGG1 avec ces deux complexes, uniquement après un stress oxydatif, et notre étude par microscopie FLIM-FRET a révélé une forte proximité d'OGG1 et de CDK8 encore une fois uniquement après stress (< 10 nm), proximité particulièrement forte sur la fraction insoluble du noyau. Même si ces données ne nous permettent pas d'attester d'une interaction directe entre ces différents complexes, elles reflètent cependant une association spécifiquement induite par le stress oxydatif. Enfin nos résultats nous ont mené à explorer le rôle des sous-unités paralogues du module CDK du Médiateur dans le recrutement d'OGG1. Il s'est avéré que les sous-unités paralogues CDK19, MED12L et MED13L respectives de CDK8, MED12 et MED13 sont également nécessaires à la relocalisation d'OGG1, et que CDK19 et MED12L, de façon similaire à CDK8 et MED12, sont recrutées comme OGG1 sur la chromatine après un stress oxydatif. Cependant l'activité kinase de CDK8/CDK19, les seules protéines du Médiateur possédant une activité enzymatique, n'est requise ni pour le recrutement d'OGG1 sur la chromatine, ni pour la réparation de la 8-oxoG.

Quel modèle pouvons-nous proposer ?

Au vu des résultats présentés ci-dessus, nous sommes en mesure de proposer le modèle suivant :

Nous savons que le complexe Médiateur et les cohésines participent à l'organisation du génome, via la formation de boucles, supposées rapprocher les enhancers des promoteurs des gènes (Kagey et al., 2010; Seitan et al., 2011; Chien et al., 2011). Nous avons pu observer qu'en absence de tout stress oxydatif, les cohésines, le corps du Médiateur et les sous-unités MED13/CyC du module CDK sont présents sur la fraction chromatinienne de l'ADN (Figure 1A). Lorsqu'un stress oxydatif tel que le bromate de potassium (KBrO_3) est appliqué sur des cellules Hela OGG1-GFP, les deux autres sous-unités du module CDK, MED12 et CDK8, sont recrutées sur l'ADN via les sous-unités déjà présentes (Figure 1B). Les complexes Médiateur (le corps associé au module CDK) et les cohésines permettent alors le recrutement d'OGG1 au niveau de la chromatine (Figure 1B). Si au contraire les cohésines ou le corps du Médiateur sont absents, le recrutement d'OGG1, de MED12 et de CDK8, ainsi que la réparation de la 8-oxoG, sont significativement affectés (Figure 1C).

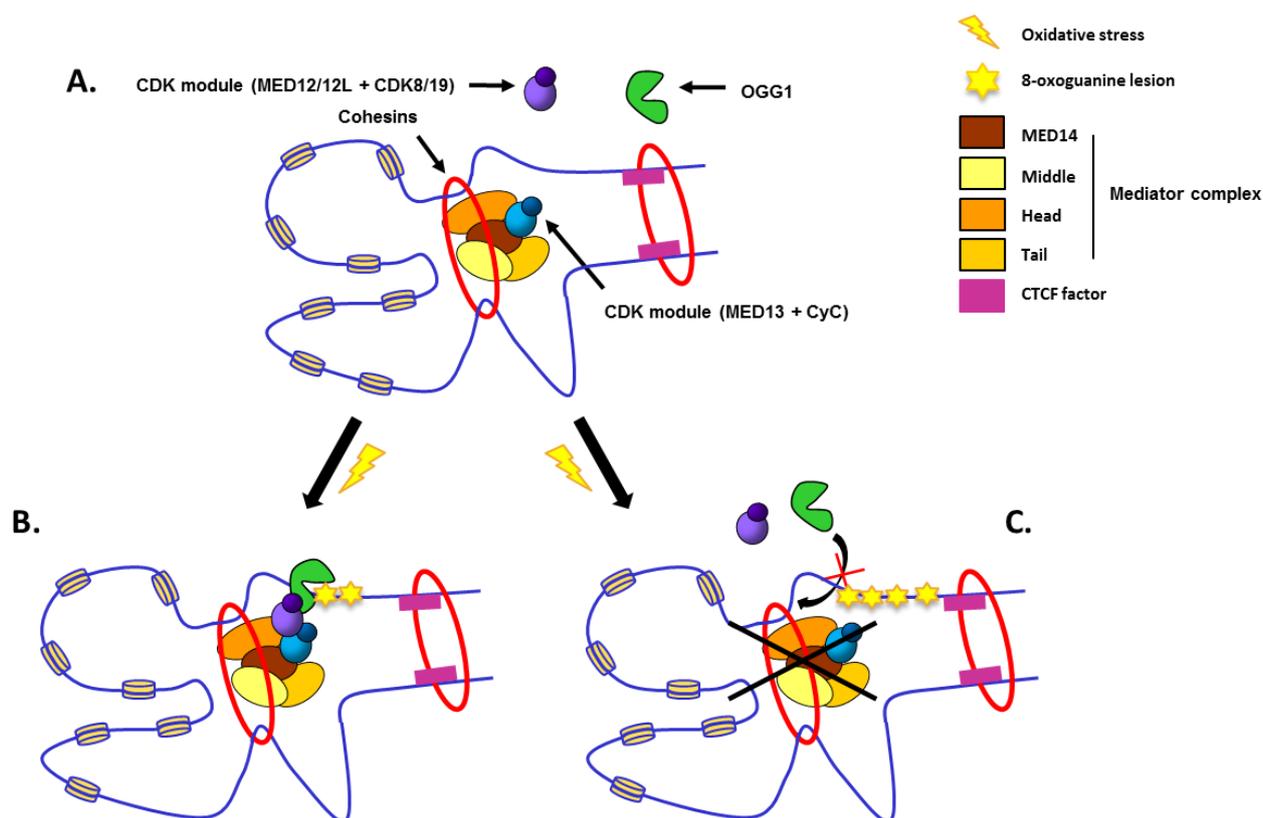


Figure 1 : Modèle des rôles respectifs des complexes Médiateur, cohésines et du facteur CTCF sur la relocalisation d’OGG1 sur la chromatine en réponse à stress oxydatif. A. Le corps du Médiateur, les sous-unités MED13 et CyC, les cohésines et le facteur CTCF sont déjà présents sur la chromatine avant tout stress oxydatif. **B.** Suite à un stress oxydatif, les sous-unités MED12/CDK8, puis OGG1, sont relocalisées sur les régions du génome co-occupées par les cohésines et le Médiateur. **C.** En absence des cohésines et du corps du Médiateur ni les sous-unités MED12/CDK8 ni OGG1 ne peuvent être recrutées sur la chromatine, ce qui se traduit par un défaut de réparation des lésions 8-oxoG.

Nous avons également pu constater une localisation bien distincte d’OGG1 et du facteur CTCF sur la chromatine après l’induction de dommages oxydatifs. Cette observation est particulièrement importante, puisqu’elle nous informe sur une localisation et donc une fonction bien spécifique des cohésines en lien avec le BER. En effet, il a été montré que les cohésines pouvaient co-occuper de manière exclusive des sites du génome soit avec le Médiateur soit avec le facteur CTCF (Kagey et al., 2010; Hnisz et al., 2013). De plus les cohésines et la protéine de chargement NIPBL co-localisent aux régions riches en enhanceurs et en promoteurs, susceptibles d’être enrichies en Médiateur, tandis que NIPBL est absente des sites co-occupés par les cohésines et CTCF. En outre, les sous-unités SA1/SA2 co-localisent avec les cohésines associées au CTCF (Kagey et al., 2010). Il est intéressant de noter que NIPBL fait partie des gènes identifiés par le crible à haut débit dont l’inactivation diminue la relocalisation d’OGG1 après stress, tandis que l’inactivation des sous-unités SA1/SA2 n’avait pas d’effet significatif. L’ensemble de ces résultats suggère alors une fonction des cohésines qui peut se distinguer par les protéines avec lesquelles elles sont associées : soit les cohésines sont physiquement associées au facteur CTCF et aux protéines SA1/SA2, ce qui les fait intervenir dans

l'organisation topologique du génome (Wang and Dostie, 2017) ; soit les cohésines sont associées au Médiateur dans des régions contenant enhancers et promoteurs, via la formation de boucles les rapprochant, contribuant ainsi à la régulation des gènes (Seitan et al., 2011; Chien et al., 2011). Si l'on suit cette hypothèse, OGG1 devrait donc être relocalisée uniquement dans les régions co-occupées par les cohésines et le Médiateur, puisque ces complexes sont indispensables à son recrutement, ces régions étant appauvries en facteur CTCF. Une façon de vérifier cette hypothèse serait de réaliser des expériences de ChIP-seq afin d'identifier les zones du génome occupées par OGG1 avant et après traitement par un stress oxydatif. La meilleure stratégie serait d'effectuer une immunoprécipitation contre OGG1, ainsi que contre les cohésines, le Médiateur ou encore CTCF, et de suivre leur co-association ou leur exclusion sur l'ensemble du génome. Ceci permettrait d'évaluer la présence d'OGG1 sur des régions du génome connues pour être enrichies en Médiateur par exemple, tels que les promoteurs. Récemment la localisation des lésions 8-oxoG au sein du génome de souris a été caractérisée par une approche nommée « OG-seq » (8-oxo-7,8-dihydroguanine-seq), développée par l'équipe de Cynthia Burrows (Ding et al., 2017). Dans cette étude les lésions « OG » sont marquées par de la biotine, permettant une purification basée sur l'affinité de la forme « OG » biotinylée pour la streptavidine, plutôt que sur une immunoprécipitation des lésions par un anticorps anti-8-oxoG. Cette stratégie a permis d'améliorer l'enrichissement des lésions purifiées de 30 à 40% par rapport à une immunoprécipitation. Ce type d'approche serait transposable aux cellules humaines, nous permettant d'explorer les zones enrichies en 8-oxoG par rapport aux sites de liaison du Médiateur, des cohésines et de CTCF. Etant donné que des études de ChIP-seq conduites chez la souris ont exploré la localisation des cohésines, du Médiateur et de la 8-oxoG, une analyse comparative serait également possible sur les données existantes.

Notre étude était tournée vers le rôle des complexes Médiateur et cohésines sur le recrutement d'OGG1, puisque le crible initial était centré sur la modulation de la relocalisation de cette enzyme. Cependant il apparaît évident et indispensable d'étudier le rôle de ces complexes sur les étapes du BER en aval d'OGG1. Nos résultats ont déjà mis en évidence la nécessité de ces complexes sur le recrutement de la protéine plateforme XRCC1. Cette protéine participant à toutes les étapes du BER (Vidal et al., 2001b; Marsin et al., 2003; Nazarkina et al., 2007), on pourrait supposer que le Médiateur et les cohésines soient impliqués eux aussi dans l'ensemble du BER. En outre, l'étape de reconnaissance de la lésion par une ADN glycosylase est considérée comme l'étape limitante du BER. Le Médiateur et les cohésines étant nécessaires à cette étape initiatrice, il serait logique qu'ils le soient également pour les étapes suivantes. De plus nous savons que ces complexes sont réellement nécessaires à la réparation de la 8-oxoG, confirmant leur rôle crucial dans cette voie de réparation. Cependant cette supposition reste à être confirmée en étudiant le rôle des complexes sur chaque étape une à une. De plus, il serait intéressant de tester leur rôle en discriminant la voie à brèche courte de la voie à brèche longue du BER, par exemple en comparant leur rôle sur le recrutement des ligases III et I. Sachant que le recrutement de la ligase III nécessite le recrutement de XRCC1 (Campalans et al, 2015), on peut déjà supposer que les complexes Médiateur et cohésines sont nécessaires à la relocalisation de la ligase III après un stress oxydatif.

Le Médiateur et les cohésines peuvent-ils intervenir dans la réparation d'autres dommages à l'ADN ?

Un autre aspect qui mériterait notre attention serait d'approfondir le rôle de ces complexes sur le recrutement d'autres ADN glycosylases. Nous avons déjà été en mesure de montrer un recrutement de NTH1 dépendant du Médiateur et des cohésines. Sachant que l'inactivation du Médiateur ou des cohésines n'affecte pas l'activité enzymatique à proprement dit d'OGG1 mais bien son recrutement physique sur l'ADN, ces complexes pourraient-ils intervenir de manière générale sur le recrutement de toutes les ADN glycosylases et donc intervenir dans tous les types de dommages pris en charge par le BER ? Si la présence physique des complexes Médiateur et cohésines était réellement nécessaire au recrutement de toute la machinerie BER, que ce soit les ADN glycosylases ou les protéines en aval, il resterait cependant à comprendre comment un même ensemble de protéines peut physiquement servir de lien entre l'ADN contenant les lésions et les protéines les réparant. Autrement dit, existe-t-il des sites de liaisons communs du Médiateur et/ou des cohésines capables de reconnaître n'importe quelle protéine du BER ? Ou cette reconnaissance fait-elle en réalité intervenir d'autres protéines, chargées de reconnaître et d'amener les protéines du BER sur les sites riches en lésions ? Cette question ouvre la voie à de futures analyses pour mieux comprendre l'implication de ces complexes dans la réparation des dommages oxydatifs.

Un lien entre le Médiateur et la réparation de l'ADN par la voie du NER avait été mis en évidence chez la levure (Eyboulet et al., 2013) et l'homme (Kikuchi et al., 2015), suggérant des fonctions plus étendues que celles concernant la transcription. De même, les cohésines étaient connues pour participer à la réparation des CDB (Kim et al., 2002a; Ström et al., 2004; Ünal et al., 2004) dans des phases précises du cycle cellulaire (Sonoda et al., 2001; Schmitz et al., 2007). En parallèle, il avait été montré que le Médiateur et les cohésines étaient physiquement et fonctionnellement associés au niveau des boucles formées entre les promoteurs et les enhanceurs (Kagey et al., 2010; Seitan et al., 2011; Chien et al., 2011). Cependant aucun lien n'avait été fait entre ces complexes et la réparation des dommages à l'ADN par la voie du BER. Toutes ces données nous ont donc naturellement mené à étudier leur impact dans la voie du BER. Même si nos études ont pour la première fois mis en évidence le rôle crucial de ces complexes dans la voie du BER, l'étape suivante serait de pouvoir croiser toutes ces informations. Autrement dit, les cohésines pourraient-elles avoir un rôle dans la voie du NER, et le Médiateur pourrait-il participer à la réparation des CDB ? Pour le moment, aucun élément ne permet de répondre à ces questions. Cependant, si le Médiateur intervient bien dans la voie du NER, et sachant que les cohésines sont chargées de favoriser la formation de boucles passant par le Médiateur, il serait intéressant de savoir si les cohésines pourraient avoir un rôle collaboratif avec le Médiateur dans la réparation des dommages à l'ADN par la voie du NER.

On pourrait alors envisager que ces complexes aient un rôle majeur et encore mal connu dans la maintenance de la stabilité du génome, permettant une régulation des différentes voies de réparation.

Quel est le lien entre la réparation par la voie du BER et la transcription ?

Nos résultats ont montré un recrutement d'OGG1 dans les domaines d'euchromatine du noyau, recrutement qui dépend de plus du complexe du Médiateur. Connaissant le rôle du Médiateur dans la régulation de la transcription, ces résultats suggéraient un lien entre la voie du BER et le processus de transcription. Il est généralement accepté qu'il existe une forme de coordination pour éviter les interférences entre la réparation des lésions produites dans l'ADN et la transcription. Ceci est particulièrement vrai pour les cassures simple et double brin de l'ADN ainsi que les lésions induites par UV (Khobta and Epe, 2012; Fong et al., 2013), entraînant d'importantes distorsions de la double hélice d'ADN. Dans la voie du BER, il n'existe cependant aujourd'hui aucune évidence solide de cette coordination entre transcription et réparation. Même si certaines bases oxydées telles que les thymines glycol sont connues pour bloquer les polymérases, d'autres telles que la 8-oxoG ne sont pas considérées comme des lésions bloquantes (Larsen et al., 2004; Charlet-Berguerand et al., 2006). Cependant, il est fort probable que les nombreuses enzymes du BER requises pour le déplacement de la lésion hors de la double hélice d'ADN, ainsi que les intermédiaires générés pendant le processus tels que les sites abasiques, interfèrent avec la machinerie transcriptionnelle. En effet, il a été montré que la reconnaissance de la lésion 8-oxoG par OGG1 inhibait la progression de la transcription (Khobta et al., 2009; Kitsera et al., 2011). Ces résultats ont été obtenus dans un système de plasmide contenant des lésions 8-oxoG synthétiques, nécessitant donc de plus amples études afin de caractériser les conséquences de la présence de 8-oxoG directement dans le génome cellulaire sur le processus de transcription.

En outre, nous avons pu observer une bonne corrélation entre le recrutement d'OGG1 sur la chromatine et une diminution de la transcription globale après l'induction d'un stress oxydatif par KBrO_3 (résultats complémentaires). Même si aucun élément ne permet de relier ces deux événements, ces résultats montrent un blocage de la transcription qui coïncide temporellement avec le processus de réparation. Une façon d'explorer le rôle d'OGG1 vis-à-vis de la transcription serait par exemple d'utiliser soit un inhibiteur d'OGG1 empêchant à la fois son activité et sa liaison avec son substrat, soit une forme mutante de l'enzyme incapable de se lier à la 8-oxoG, et de suivre la transcription après un traitement par KBrO_3 . De plus, d'après nos études, le recrutement d'OGG1 nécessite la présence du module CDK du Médiateur, et la relocalisation d'OGG1 est accompagnée d'une relocalisation des sous-unités MED12 et CDK8 dans les mêmes régions nucléaires. Or l'association du module CDK avec les autres modules du Médiateur participerait à la répression de la transcription (Hengartner et al., 1998; Knuesel et al., 2009a). Une hypothèse serait donc que la cellule utilise ce module CDK pour coordonner les événements de réparation et de transcription. En effet la présence du corps du Médiateur et des cohésines dans les régions du génome sujettes à la production de dommages oxydatifs permettrait le recrutement du module CDK. Ce module CDK pourrait alors favoriser l'arrêt de la transcription et le recrutement d'OGG1, ce qui laisserait le temps et l'espace nécessaire à la machinerie du BER pour réparer les dommages à l'ADN. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions par exemple utiliser des siRNAs contre les sous-unités du Médiateur, seuls ou en combinaison, pour déterminer si le blocage de la transcription observé après un traitement par KBrO_3 est maintenu en absence de ces protéines. Un autre aspect à étudier serait de comprendre comment le module CDK peut concrètement favoriser l'arrêt de la transcription.

Aujourd'hui, différents modèles sont proposés pour expliquer ce phénomène. Certaines études proposent une répression qui nécessite l'activité kinase de CDK8 (Hengartner et al., 1998; Akoulitchev et al., 2000), tandis que d'autres ont montré une interférence physique du module CDK avec l'ARN Pol II totalement indépendante de son activité enzymatique (Elmlund et al., 2006; Knuesel et al., 2009a). Pour le moment, la seule information que nous avons est un recrutement d'OGG1 indépendant de toute activité enzymatique de CDK8. Cependant cela ne veut pas nécessairement dire que cette activité n'est pas requise pour procéder à l'inhibition de la transcription observée.

Comment caractériser de façon spatiotemporelle la dynamique nucléaire de la réparation par le BER ?

L'ensemble de nos études ont été réalisées sur des cellules fixées à des temps caractéristiques, tels que le temps K0, juste après la fin du traitement par KBrO₃, ou le temps K3, c'est-à-dire 3h après la fin du traitement, temps auquel le recrutement d'OGG1 dans des cellules sur-exprimant OGG1-GFP est bien caractérisé. Nos analyses par microscopie confocale nous ont fourni de précieuses informations sur la localisation nucléaire d'OGG1 vis-à-vis des complexes cohésines et Médiateur. Cependant certaines questions, aujourd'hui sans réponse, devraient faire l'objet de futures recherches. Par exemple, comment s'assurer de l'ordre des événements que nous avons été en mesure d'observer ? Nos résultats suggèrent pour le moment la séquence d'événements suivants : les cohésines et le corps du Médiateur sont présents dès le départ sur la chromatine ; ces complexes permettent ensuite le recrutement de MED12 et de CDK8, protéines qui permettent enfin le recrutement d'OGG1. Cependant, aucune donnée ne nous permet réellement d'attester de la véracité de cette séquence, si ce n'est peut-être les expériences de micro-irradiation. En effet après l'induction de 8oxoG par micro-irradiation laser dans des cellules sur-exprimant OGG1-mcherry et CDK8-GFP le recrutement de CDK8 est détectable juste avant celui d'OGG1 sur la zone irradiée. Malheureusement, le système utilisé pour cette étude ne nous permettait pas d'enregistrer de signal pendant le temps d'irradiation (5 secondes). Cette information serait cruciale, étant donné la rapidité des processus de recrutements (le recrutement de CDK8 atteint un plateau au bout d'une dizaine de secondes, sachant que le temps d'irradiation est déjà de 5 secondes). Une alternative à cette impasse serait de réduire davantage le temps de micro-irradiation et/ou d'imager à une vitesse supérieure pour suivre les premières étapes de recrutement. Cela serait également l'occasion de compléter nos résultats en étudiant la dynamique en temps réel d'autres sous-unités du Médiateur et des cohésines suite à l'induction de dommages oxydatif par micro-irradiation laser.

Même si la micro-irradiation laser permet une approche plus dynamique des phénomènes que l'observation de cellules fixées, cette technique n'en reste pas moins peu résolutive. La résolution spatiale de notre confocal actuel est de 200-250 nm. D'autres approches combinant une meilleure résolution spatiale et temporelle devraient donc être développées afin d'explorer les dynamiques réciproques du BER, du Médiateur et des cohésines. Une telle combinaison serait notamment possible grâce aux nouvelles technologies de microscopie de super-résolution en cellule unique. Ces techniques qui englobent le PALM

(PhotoActivated Localization Microscopy) et le STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) permettent la détection de molécules avec une résolution de 20-50 nm, résolution qui devient donc au moins quatre fois supérieure à celle d'un confocal classique, et nous donnent également accès à la position 3D des molécules distribuées dans le nucléoplasme (Izeddin et al., 2014). Ces techniques peuvent de plus être utilisées en temps réel, permettant par exemple de suivre la dynamique de formation des clusters d'OGG1 après un traitement par KBrO₃. Cette approche pourrait être couplée à d'autres marqueurs, de l'hétérochromatine notamment, pour suivre la formation des clusters en fonction du contexte chromatinien.

Ces techniques de super-résolution peuvent également être couplées à ce qu'on appelle communément le SPT (Single Particle Tracking ou suivi de particules uniques). L'intérêt de cette approche est de suivre la diffusion de protéines individuelles jusqu'à leur liaison sur des sites spécifiques dans le noyau en temps réel. Les trajectoires de molécules uniques d'OGG1 pourraient ainsi être comparées avant et après un stress oxydatif afin de répondre aux questions suivantes : Comment OGG1 cherche-t-elle et trouve-t-elle les lésions 8-oxoG au sein du noyau ? Et son processus de recherche de la lésion diffère-t-il en fonction de la quantité de lésions produites dans le génome ? Parallèlement, le suivi des lésions 8-oxoG elles-mêmes serait grandement informatif. La répartition spatiale des lésions 8-oxoG a déjà fait l'objet de plusieurs études. Notamment, il a été montré que les lésions 8-oxoG étaient enrichies dans les promoteurs de gènes et dans les régions codant pour les UTR du génome de fibroblastes murins (Ding et al., 2017). Une autre étude a également étudié la localisation spatiale des 8-oxoG dans le génome de rat, révélant une forte corrélation des lésions avec les domaines associés à la lamine en périphérie du noyau (Yoshihara et al., 2014). Cependant aucune étude n'a encore été réalisée en temps réel, par microscopie, et en comparant des cellules traitées ou non par un stress oxydatif. Cet axe de recherche représente malgré tout une difficulté majeure : comment suivre les lésions 8-oxoG en temps réel ? En effet notre protocole de détection de la lésion par immunofluorescence nécessite une étape de dénaturation de la double hélice d'ADN, permettant d'avoir accès à la lésion enchevêtrée à l'intérieur de l'ADN. Or toute tentative de marquer la 8-oxoG pour la suivre en temps réel risque de se confronter à la même problématique.

Enfin l'ensemble des paramètres décrits dans les paragraphes précédents pourraient être étudiés en absence du Médiateur et des cohésines, révélant ainsi l'impact de ces complexes sur la capacité d'OGG1 à explorer l'environnement nucléaire et à trouver sa lésion substrat. Nos résultats ont déjà mis en évidence le rôle du Médiateur dans la réparation de la 8-oxoG. De plus, nous avons pu observer des foci devenant de plus en plus nombreux et volumineux au cours du temps en absence du corps du Médiateur (siMED14). Suivre l'évolution en temps réel des lésions (nombre, volume), ainsi que la dynamique d'OGG1 (trajectoires, temps d'immobilisation, etc.) en absence de différentes sous-unités du Médiateur et des cohésines nous aiderait donc à comprendre comment OGG1 est capable d'arriver jusqu'à sa destination finale, la lésion 8-oxoG.

Quel est le signal déclencheur de l'association du BER sur l'ADN ?

Malgré les réponses cruciales que nous ont apportées nos recherches, nous ne savons toujours pas pour le moment quel signal est susceptible de déclencher la relocalisation de la machinerie BER sur ses sites de réparation spécifiques. Cependant nous savons maintenant que le Médiateur et les cohésines sont impliqués dans ce processus. Or ces complexes sont connus pour subir de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT). Des MPT de ces complexes ont d'ailleurs été identifiées spécifiquement en réponse à un stress. Par exemple, le Médiateur est phosphorylé en de multiples sites sur 17 de ses sous-unités chez la levure, ces phosphorylations étant modifiées en réponse à un stress osmotique (Miller et al., 2012). De même, les sous-unités SMC1, SMC3 et RAD21 sont spécifiquement phosphorylées en réponse à des radiations ionisantes (Heidinger-Pauli et al., 2008; Kim et al., 2002b; Yazdi et al., 2002). Nos résultats complémentaires ont par ailleurs confirmé l'induction d'une phosphorylation de la sous-unité SMC1 après un traitement par KBrO_3 . Même s'il est impossible à ce stade de relier directement cette phosphorylation au recrutement d'OGG1, ces résultats suggèrent néanmoins la possibilité de telles MPT en réponse au traitement par KBrO_3 . L'exploration du rôle de ces MPT pourrait par exemple se faire en deux étapes : 1) identifier par spectrométrie de masse les MPT des sous-unités du Médiateur et des cohésines en absence et en présence d'un traitement par KBrO_3 ; 2) muter les résidus cibles modifiés uniquement après stress et réaliser une co-immunoprécipitation entre OGG1 et la sous-unité en question, révélant ainsi la nécessité ou non de ces MPT sur l'association testée, ou encore suivre la relocalisation d'OGG1 par microscopie dans des cellules exprimant les formes mutantes. Une autre possibilité serait de rechercher par spectrométrie de masse les MPT du Médiateur et des cohésines suite à une immunoprécipitation contre OGG1, idéalement dans la fraction chromatiniennne (après un lavage par CSK).

Un autre groupe de protéines connues à la fois pour leur nombreuses MPT et pour leur rôle dans la réparation de l'ADN sont les histones composant les nucléosomes. Les nucléosomes permettent la compaction de l'ADN, mais représentent par la même occasion une solide barrière pour les systèmes de réparation qui doivent avoir accès aux lésions enchevêtrées au sein de la chromatine. Une décompaction de la chromatine et une réorganisation des histones sont alors indispensables, comme cela a été montré pour les lésions induites par UV (Jiang et al., 2010; Courilleau et al., 2012; Dinant et al., 2013) ainsi que pour la réparation des CDB (Kruhlak et al., 2006; Goodarzi et al., 2008). Des études *in vitro* ont également mis en évidence une inhibition de certaines étapes du BER en présence de nucléosomes (Menoni et al., 2007, 2012b). OGG1 interagirait de plus avec des remodeleurs de la chromatine (Charles Richard et al., 2016) ainsi que certains modificateurs d'histones (Zhou et al., 2018). Ces études suggèrent une coordination entre la machinerie du BER et le remodelage de la chromatine. En outre, le crible à haut débit à l'origine de ce projet a identifié la méthyltransférase SETDB1 comme gène candidat dont l'inactivation diminuerait la relocalisation d'OGG1. SETDB1 est une méthyltransférase capable de tri-méthyle l'histone H3 (H3K9me3), associée à une répression de la transcription et à la formation d'hétérochromatine (Ropa et al., 2018; Rao et al., 2017). Cette triméthylation serait également essentielle pour la réparation des CDB (Burgess et al., 2014). D'après nos études préliminaires, la diminution des niveaux de SETDB1 par un siRNA entraîne non pas une diminution du recrutement d'OGG1, mais plutôt la formation de foci OGG1 avec un profil bien distinct de ce qui est normalement observé après un traitement par

KBrO₃. Comment alors SETDB1 intervient-elle dans la relocalisation d'OGG1 ? Une compaction locale de la chromatine participerait-elle au déclenchement du BER, comme cela a été suggéré pour la réparation des CDB ? Son activité de répression de la transcription a-t-elle un rôle ici ? Concernant cette dernière hypothèse, existerait-il un lien entre cette activité et le recrutement de CDK8 observé après traitement par KBrO₃ ? Pour répondre à ces questions de plus amples études seront nécessaires, par exemple en suivant l'état de méthylation de l'histone H3K9 ou la relocalisation de SETDB1 au sein du noyau en fonction d'un stress oxydatif.

En parallèle de l'étude des MPT potentiellement impliquées dans le recrutement d'OGG1 sur la chromatine, la recherche de nouveaux facteurs engagés dans ce processus serait primordiale. Dans notre projet nous avons choisi d'utiliser une approche par BioID (Biotin Identification), permettant de marquer par de la biotine toute protéine située dans un environnement de 10 nm de la protéine cible (OGG1 dans notre cas) (Kim and Roux, 2016). Cette étude nous a permis d'identifier les protéines physiquement proches d'OGG1 avant et après traitement par KBrO₃. L'analyse des résultats a permis d'identifier 106 protéines préférentiellement biotinylées après un traitement par KBrO₃, en comparaison de la condition non traitée. Parmi cette centaine de candidats, plusieurs protéines associées à une inhibition de la transcription ont été identifiées. Par exemple, le facteur TIF1 β s'est vue particulièrement enrichi en biotine après traitement oxydatif (26 peptides retrouvés dans les cellules OGG1-BirA traitées, versus 1 peptide retrouvé dans les mêmes cellules non traitées). Ce facteur, aussi connu sous le nom KAP-1, KRIP1 ou TRIM28, participe à la répression de la transcription via sa liaison avec les domaines KRAB (Kruppel-Associated Box) (Friedman et al., 1996). TIF1 β interagit avec et recrute notamment Mi-2 α , un composant du complexe de désacétylation des histones NuRD (Schultz et al., 2001), la méthyltransférase SETDB1 (Schultz et al., 2002), ainsi que la protéine d'hétérochromatine HP1, recrutements nécessaires à son activité de répression (Sripathy et al., 2006). Il a également été montré qu'une relaxation de la chromatine en réponse aux CDB de l'ADN est modulée via la phosphorylation de TIF1 β sur la S824, phosphorylation dépendante d'ATM (Ziv et al., 2006). De plus, l'invalidation de TIF1 β dans des cellules irradiées entraîne une augmentation de la taille (mais pas du nombre) des foci γ H2AX, démontrant qu'une compaction de la chromatine est réfractaire à l'expansion des foci (Goodarzi et al., 2008). Enfin, le complexe SETDB1 - TIF1 β permettrait de recruter le remodelleur ATRX au niveau de gènes codant pour des protéines en doigt de zinc, plus particulièrement en l'extrémité 3' des exons (Valle-García et al., 2016). Or ces régions de la chromatine sont atypiques, puisqu'elles sont enrichies en chromatine permettant normalement une transcription active, mais contiennent également une forte méthylation de type H3K9me3 (une marque d'inhibition de la transcription) et de type H3K36me3 (une marque d'élongation de la transcription) (Blahnik et al., 2011). Une analyse par ChIP-seq a révélé une co-occupation d'ATRX avec SETDB1 et TIF1 β sur ces régions atypiques de gènes contenant une signature H3K9me3/H3K36me3 (Valle-García et al., 2016). Une délétion d'ATRX dans cette même étude entraîne de plus une augmentation des dommages à l'ADN reflétée par une augmentation de la production de la forme γ H2AX. Il est intéressant de noter que la protéine ATRX fait également partie des protéines significativement et uniquement biotinylées après un traitement par KBO3, ce qui traduit sa proximité avec OGG1 uniquement après un stress oxydatif. Ces résultats par BioID pourraient être reliés aux résultats du crible identifiant SETDB1 comme

étant nécessaire à la distribution d'OGG1 sur les régions d'euchromatine, comme discuté précédemment. Si l'on regroupe les deux approches, il semblerait que SETDB1, TIF1 β et ATRX, protéines connues pour agir ensemble dans la régulation de la transcription, interviennent aussi dans la relocalisation d'OGG1 après un stress oxydatif. Il nous reste maintenant à comprendre comment cet ensemble de protéines est impliqué dans la régulation de la dynamique d'OGG1.

Notre analyse de BioID a également mis en évidence la proximité d'OGG1 avec certains composants de la machinerie de transcription spécifiquement après stress, dont la sous-unité 2 de l'ARN Pol II (RPB2) et la sous-unité TAF9 (TATA-box binding protein Associated factor 9) du facteur TFIID. Ces deux facteurs sont généralement associés à une transcription active des gènes, reflétant la présence d'OGG1 dans des régions transcrites, ce qui paraît donc à l'opposé du paragraphe discuté ci-dessus. Cependant, plusieurs études ont proposé la 8-oxoG comme un signal épigénétique lorsque celle-ci est présente dans le promoteur d'un gène, favorisant ainsi la transcription (Fleming et al., 2017; Pan et al., 2016). Or rien ne nous permet de distinguer la présence d'OGG1 dans des sites promoteurs ou non dans notre étude par BioID. On pourrait alors imaginer que les protéines retrouvées dans l'environnement immédiat d'OGG1 sont différentes en fonction de sa localisation sur l'ADN, et donc potentiellement en fonction de son rôle sur le génome. Ceci pourrait expliquer la présence du facteur TFIID à proximité d'OGG1, ce facteur général de la transcription se fixant spécifiquement sur les sites promoteurs des gènes (Sainsbury et al., 2015).

Nous savons qu'après un stress oxydatif OGG1 colocalise avec la forme active de l'ARN Pol II et les ARNm (Amouroux et al, 2010), tout en sachant que la transcription globale est parallèlement bloquée (Figure 22 des résultats). Notre étude par BioID a également révélé la proximité d'OGG1 avec différentes protéines impliquées dans la régulation de la transcription, ces protéines possédant parfois des fonctions opposées. En outre la transcription est un processus extrêmement dynamique et régulé de nombreuses façons. D'après les résultats obtenus jusqu'à aujourd'hui, il semble néanmoins évident qu'il existe un lien et/ou une coordination entre la transcription et la réparation par la voie du BER, même si nous ne comprenons pas encore les mécanismes sous-jacents.

Quel est l'intérêt thérapeutique de pouvoir moduler la relocalisation et/ou l'activité d'OGG1 ?

Les dommages oxydatifs de l'ADN sont avant tout liés au processus de carcinogenèse, suite à l'apparition de mutations dans des gènes clés du génome. Au premier abord, on peut donc penser que l'intégrité des systèmes de réparation tels que le BER est indispensable pour prévenir l'apparition de tumeurs. Cependant, de nombreux agents anti-cancéreux en clinique sont des agents dits génotoxiques (tels que la cisplatine ou la bléomycine), c'est-à-dire des agents provoquant l'apparition de lésions dans l'ADN. Dans ce cas bien précis le développement de résistances peut être expliqué par une augmentation de la capacité des cellules à réparer les lésions créées (Helleday et al., 2008). L'objectif devient alors non pas de favoriser une réparation efficace, mais à l'inverse de cibler les protéines de réparation en vue

d'augmenter la formation de dommages à l'ADN (Gavande et al., 2016). Jusqu'à aujourd'hui, peu d'études se sont intéressées à la modulation de l'activité des ADN glycosylases. Ceci peut éventuellement s'expliquer par le manque de phénotype fort retrouvé par exemple chez les souris *Ogg1*^{-/-} ou *Myh*^{-/-}. Quelques exemples cependant ont prouvé l'utilité de telles stratégies ciblant d'autres protéines du BER, comme l'illustre l'utilisation d'inhibiteurs de PARP en clinique dans le traitement du cancer du sein ou de l'ovaire (Helleday et al., 2008), le développement d'inhibiteurs de MTH1 favorisant les réponses cytotoxiques de traitements anti-cancéreux chez la souris (Gad et al., 2014), ou encore l'utilisation d'inhibiteurs d'APE1 dans le traitement du cancer du pancréas (Zou and Maitra, 2008). Le développement d'inhibiteurs spécifiques d'ADN glycosylases, particulièrement OGG1, serait également pertinent dans le contexte de la maladie d'Huntington. En effet, la réparation de la 8-oxoG initiée par OGG1 déclenche une répétition de cycles d'oxydation – excision qui initie l'expansion progressive d'une répétition de trinuécléotides CAG dans le gène codant la protéine huntingtine (Kovtun et al., 2007). Cette expansion altère l'interaction de la protéine avec ses partenaires moléculaires et est directement associée avec la maladie. Des modèles de souris invalidées du gène *Ogg1* présentent un retard ou une suppression de l'expansion de ces triplets CAG (Budworth et al., 2015). Dans ce contexte, le développement d'inhibiteurs d'OGG1 trouve tout son sens. Actuellement, différents types d'inhibiteurs existent : 1) des inhibiteurs ciblant l'ADN : soit des analogues de sites AP, soit des nucléotides possédant une liaison glycosidique stabilisée, les empêchant d'être prises en charge par l'ADN glycosylase ; 2) des petites molécules inhibitrices de l'activité enzymatique (Boiteux et al., 2017). La plupart de ces composés manquent cependant d'études *in vivo* (à notre connaissance une seule étude a testé l'effet d'un inhibiteur sur la réparation de la 8-oxoG dans des cellules Hela (Tahara et al., 2018) permettant de caractériser leur comportement dans la cellule, en commençant par vérifier leur capacité à traverser la membrane cytoplasmique et la membrane nucléaire. Ce projet de recherche a de plus mis en avant la nécessité des complexes Médiateur et cohésines pour le recrutement d'OGG1 et la réparation de la 8-oxoG. Cibler ces complexes serait donc peut-être un moyen de cibler indirectement OGG1. Si ces complexes s'avèrent nécessaires à l'action du BER de façon générale, ils pourraient représenter une cible thérapeutique de choix dans la prise en charge de plusieurs pathologies. Le rôle d'OGG1 dans le développement de pathologies, notamment neurodégénératives, est néanmoins bien plus complexe qu'il n'y paraît. En effet un défaut de l'expression d'OGG1 (Sliwinska et al., 2017) ou des mutations d'OGG1 touchant son activité catalytique (Jacob et al., 2013) ont également été associés à la maladie d'Alzheimer. Dans ce cas, la stratégie à adopter serait à l'inverse de stimuler son activité. Le développement de molécules stimulant/activant directement l'activité catalytique d'OGG1 serait donc un moyen d'explorer le rôle de cette protéine dans la maladie d'Alzheimer. A terme, cette stratégie pourrait contribuer à la prise en charge thérapeutique de cette maladie.

La réparation de la 8-oxoG par OGG1 apparaît finalement comme un processus dont les mécanismes restent encore mal connus à de nombreux égards. Une meilleure compréhension de la coordination entre la réparation de l'ADN, la transcription de l'ADN et l'organisation de la chromatine semble indispensable pour pleinement comprendre le rôle de cette protéine sur notre génome. *In fine*, l'identification des mécanismes moléculaires ainsi que des facteurs impliqués dans la réparation de bases oxydées de manière générale pourrait être utilisée dans la

conception de nouvelles thérapies. Elle pourrait notamment fournir des éléments pour le choix d'agents chimiothérapeutiques qui optimiseraient les réponses des cellules tumorales aux dommages de l'ADN. Une modulation contrôlée de l'activité enzymatique des protéines du BER permettrait également d'explorer leur rôle dans différentes pathologies neurodégénératives. Les retombées de ces futures recherches seraient donc de contribuer à établir les fondements théoriques pour l'amélioration du pronostic et de la prise en charge thérapeutique d'un ensemble conséquent de maladies.

Matériel et méthodes

Culture cellulaire

L'ensemble des expériences ont été réalisées soit sur une lignée de cellules HeLa exprimant OGG1-GFP de façon stable, donc surexprimant OGG1 fusionnée à la GFP, générée par l'équipe du LRIG avant mon arrivée, soit sur une lignée de cellules HeLa transfectées transitoirement avec différents plasmides. Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline-streptomycine dans une étuve à 37°C et 5% de CO₂.

Les transfections transitoires de plasmides ont été réalisées avec de la Lipofectamine® 2000 (ThermoFisher, référence 11668-019), selon le protocole recommandé par le fournisseur. Les cellules ont été transfectées la veille du jour des traitements, de façon à laisser la transfection 24h avant de traiter les cellules. De façon générale, les plasmides et la lipofectamine ont été dilués séparément dans du DMEM et incubés pendant 5 min à température ambiante. Puis les plasmides ont été ajoutés sur la lipofectamine et ce mélange a été incubé pendant 10 min supplémentaires avant d'être ajouté sur les cellules. Le ratio final était de 100 ng de plasmide : 1 µl de lipofectamine. Les expériences réalisées dans ce projet ont nécessité les constructions suivantes : OGG1-GFP, OGG1-mcherry, OGG1-Halotag, CDK8-GFP, CDK8-Halotag, MED12-GFP, MED12-Halotag, MED12L-Halotag, MED13-Halotag, MED13L-Halotag, Cycline C-Halotag, XRCC1-GFP et NTH1-GFP. Les constructions ont été réalisées par le LRIG ou par le service CiGEx (Cellule d'Ingénierie Génétique et d'Expression) de l'IRCM. Les fusions des sous-unités du Médiateur au Halotag ont été obtenues par PROMEGA. Pour les plasmides portant un Halotag, une incubation avec un ligand était nécessaire pour révéler la localisation de la protéine de fusion. Dans notre cas nous avons utilisé le ligand Halotag®TMR (Promega, référence G8251) qui forme une liaison covalente avec le tag une fois ajouté au milieu de culture. Nous avons incubé le ligand TMR 15 min avec les cellules, à la concentration finale de 5 µM. Puis les cellules ont été lavées pendant 30 min dans du milieu complet chaud et propre avant d'être fixées, afin d'éliminer l'excès de ligand non fixé au tag.

Les transfections par siRNAs ont été réalisées avec de la Lipofectamine® RNAiMAX (ThermoFisher, référence 13778-150), selon le protocole recommandé par le fournisseur. Le détail des siRNAs utilisés, leurs références ainsi que leurs séquences, sont listés en annexe 2. Succinctement, les siRNAs ont été incubés avec la lipofectamine pendant 15 min dans les plaques de culture, puis les cellules ont été ajoutées sur les complexes siRNA/lipofectamine. Les siRNAs ont été utilisés à la concentration de 2 µM avec le ratio suivant : 10 µl de siRNA : 1 µl de lipofectamine. Les siRNAs ont ensuite été laissés pendant 72h dans le milieu de culture.

Le nombre de cellulesensemencées de J0 pour J3 en fonction du support utilisé et des conditions de culture est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1 : Conditions d'ensemencement des cellules en fonction du support de culture utilisé et de la transfection ou non par des siRNAs. Les expériences types associées à ces conditions sont également listées.

Format du support	Culture classique	Culture avec siRNAs	Type d'expérience associée
96 puits	5 000 cellules	8 000 cellules	Recrutement d'OGG1
8 puits	15 000 cellules	20 000 cellules	Recrutement d'OGG1 Cycle cellulaire Réparation de la 8-oxoG Transcription
4 puits	30 000 cellules	40 000 cellules	Recrutement d'OGG1 Micro-irradiation
6 puits Boîte pétri 30 mm	150 000 cellules	200 000 cellules	Vérification des siRNAs par western blot FLIM-FRET
Boîte pétri 100 mm	1.5.10exp6 cellules		Test d'activité BirA Dynamique des protéines par western blot
Boîte pétri 150 mm	2.5.10exp6 cellules		Co-immunoprécipitation

Stress oxydatifs

L'objet de ce projet de recherche était d'étudier le rôle du Médiateur de la transcription et des cohésines dans la voie de réparation de l'ADN par le BER suite à un stress oxydatif. Nous avons donc utilisé deux types de stress oxydatifs pour induire des lésions à l'ADN : du bromate de potassium (KBrO_3) à la concentration de 40 mM et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à la concentration de 0.5, 1 ou 2 mM. Le KBrO_3 est utilisé en routine au sein du laboratoire depuis plusieurs années et le protocole de ce traitement était donc déjà bien établi. Ce protocole consiste à traiter les cellules avec 40 mM de KBrO_3 dilué dans du PBS chaud pendant 45 min. Puis le traitement est généralement remplacé par du milieu DMEM complet et chaud pendant 3 heures de récupération. Cependant les temps de récupération post-traitement peuvent différer en fonction du type d'expérience. Dans la section « résultats » les temps étudiés post-traitement sont notés de la façon suivante : KX, K signifiant KBrO_3 , et X représentant le nombre d'heures après la fin du traitement (K3 signifie 3h après la fin du traitement). A la fin de cette période, les cellules sont la plupart du temps soit directement fixées avec de la PFA 2%, soit subissent d'abord un lavage avec un tampon CSK pendant 5 min avant d'être également fixées avec de la PFA 2%. Le CSK est un tampon contenant du détergent (NaCl 100 mM, sucrose 300 mM, PIPES pH 6.8 10 mM, MgCl_2 3 mM, Triton 0.5%, inhibiteur de protéase 1X), qui crée des trous dans la membrane cytoplasmique des cellules, permettant d'éliminer la fraction soluble. Suite à ce traitement il ne reste donc que la fraction insoluble de la cellule, ce qui nous permet notamment de visualiser les protéines associées à la chromatine. Dans le cadre de notre projet cette approche est primordiale, puisqu'elle nous permet de suivre le recrutement ou non des protéines sur la chromatine, avant et après les différents traitements appliqués.

En comparaison du traitement par KBrO_3 , un deuxième type de stress oxydatif a été testé, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). A l'inverse du traitement par KBrO_3 , le H_2O_2 a été

préparé dans du milieu DMEM complet et chaud à la concentration de 0.5, 1 ou 2 mM, et laissé dans le milieu de culture pendant 4 heures. Il est important de noter ici que le H₂O₂ se prépare au dernier moment avant l'incubation avec les cellules, du fait de sa faible stabilité à l'air libre. La suite du protocole (fixation PFA 2% plus ou moins précédée d'un traitement par CSK) reste identique à celle utilisée pour le traitement par KBrO₃. Je précise ici que de la PFA 2% est utilisée pour la fixation des cellules afin de préserver la GFP généralement utilisée pour suivre les protéines d'intérêt.

Immunofluorescence

Afin de visualiser les lésions 8-oxoG *in situ*, les cellules Hela OGG1-GFP ont été fixées dans un mélange acétone : méthanol (1 : 1) pendant 5 min, puis séchées à l'air libre. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS afin d'éliminer toute trace du mélange de fixation. Après 15 min d'hydratation dans du PBS, l'ADN a été dénaturé en incubant les cellules avec du HCl 2N pendant 45 min à température ambiante. Cette étape est indispensable pour permettre l'accès de l'anticorps à la lésion présente dans la double hélice d'ADN. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS et le pH a été neutralisé grâce à l'ajout de Tris-HCl 50 mM à pH 8.8 pendant 5 min. Une étape de perméabilisation a été effectuée avec du PBST-0.1% Triton avant de réaliser le marquage de la 8-oxoG. L'anticorps anti-8-oxoG a été utilisé à la concentration finale de 1 µg/ml pendant une heure à 37°C. Puis un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa-488 a été appliqué pendant une heure à 37°C pour révéler l'anticorps primaire. Enfin l'ADN nucléaire a été marqué par de l'iodure de propidium à la concentration finale de 1 µg/ml incubé avec de la RNase à 50 µg/ml pendant 30 min à 37°C. Les lamelles ont finalement été montées dans du milieu de montage Dako (Dako Fluorescent Mounting Medium, référence S3023) avant d'être visualisées par microscopie.

L'immunofluorescence ayant pour but de détecter les protéines SMC3, CTCF, CENP-F et SMC1 S967 a suivi un protocole similaire à celui utilisé pour la détection de la 8-oxoG. Cependant ce protocole s'abstenait des premières étapes, commençant directement à l'étape de perméabilisation. Les anticorps utilisés avec les références et les concentrations associées sont listés en annexe 3. Contrairement au marquage de la 8-oxoG, l'ADN nucléaire fut détecté par un marquage DAPI à la concentration de 1 µl/ml pendant 5min à température ambiante.

Western Blot

Des cellules Hela OGG1-GFP traitées ou non par KBrO₃ ont été récupérées, lavées, centrifugées et conservées sous forme de culots secs à -80°C. Les protéines ont été extraites dans un tampon contenant de la benzonase (Tris HCl 50mM pH 7.5, NaCl 20mM, MgCl₂ 1mM, SDS 0.1%, inhibiteur de protéase 1X, benzonase 0.01 U/ml), soniquées avec un bain Bioruptor® (10 min de pulses à l'intensité maximale, 30 sec ON / 30 sec OFF) et centrifugées pendant 5 min à 4°C à 12 000 rpm. Entre 20 et 40 µg de protéines ont été dénaturés 5 min à 95°C puis déposés sur un gel SDS-PAGE (gel de migration Biorad Mini-PROTEAN® TGXStain-Free™ 4-15%, référence 456-8083). Des gels de migration à gradient 4-15% ont été utilisés, permettant la révélation sur le même gel de protéines de tailles très différentes, telles que les protéines du Médiateur possédant des tailles autour de 200 kDa (tel que MED12) ou la

protéine HP1 α d'une taille de 26 kDa. Suite à leur migration et à leur séparation, les protéines ont été transférées avec l'appareil Trans-Blot®Turbo de Biorad (Programme « haut poids moléculaire », transfert à 1.3A – 25V pendant 10 min) sur membrane (membrane Biorad Trans-Blot®Turbo™, 0.2 μ m nitrocellulose mini ou midi format, référence 170-4156 ou 170-4159 respectivement). Les membranes ont été bloquées sur la nuit dans une solution de PBS-0.1% Tween avec du lait en poudre à 3%, puis incubées 1h avec les différents anticorps primaires dilués dans cette même solution de blocage (anticorps primaires listés en annexe 4). Les membranes ont été lavées 3 fois 5 min avec du PBS-0.1% Tween puis incubées 1h avec l'anticorps secondaire dilué au 1/10 000^e dans la même solution de blocage. Les anticorps secondaires étaient soit des anticorps anti-lapin soit des anticorps anti-souris en fonction de l'anticorps primaire utilisé. Ces anticorps secondaires fluorescents permettaient une révélation des protéines par lumière infrarouge (anti-souris IR800 : R-05061-250 ; anti-souris IR700 : R-05055-250 ; anti-lapin IR800 : R-05060-250 ; anti-lapin IR700 : R-05054-250, Advansta). Les membranes ont ensuite été lavées 3 fois 5 min avec du PBS-0.1% Tween. Pour révéler les protéines d'intérêt, les membranes ont finalement été scannées par l'appareil ODYSSEY CLx et la fluorescence a été mesurée grâce au logiciel Image Studio®.

Co-immunoprécipitation

Les protéines ont été extraites dans un tampon de lyse contenant de la benzonase (Tris HCl 20mM pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 1mM, NP40 0.1%, DTT 1Mm, MgCl₂ 1mM, inhibiteur de protéase 1X, benzonase 0.01 U/ml), soniquées avec un bain Bioruptor® (2 x 30s à l'intensité maximale), puis centrifugées pendant 5 min à 4°C à 12 000 rpm. Un mg de protéines a été immunoprécipité avec 2 μ g d'anticorps (protéine cible ou IgG contrôle) pendant 30 min dans la glace sans agitation. Puis 100 μ l de billes (Dynabeads M-280, Invitrogen 11204D pour les anti-lapin ; 11202D pour les anti-souris) ont été ajoutées au mélange protéines/anticorps, l'ensemble étant incubé pendant 1h à 4°C sur roue. Les billes lavées trois fois avec du tampon NP40 0.1% ont finalement été resuspendues avec 25 μ l du même tampon NP40 et 5 μ l de Laemmli 6X. Après dénaturation pendant 5 min à 95°C, l'ensemble des immunoprécipitations ou 50 μ g d'extrait protéique total (pour l'input) ont été déposés sur un gel de migration SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose (suivant le même protocole que celui décrit précédemment pour les expériences de western blot). Les conditions d'analyse des protéines présentes dans les différentes fractions (Input, immunoprécipitation contre la protéine cible ou l'IgG contrôle) étaient similaires à celles utilisées pour la détection par western blot. L'ensemble des anticorps utilisés pour les expériences de western blot (paragraphe précédent) et d'immunoprécipitation sont listés en annexe 4.

BirA pulldown

La technique de BioID (Biotin Identification) utilise une enzyme biotine ligase modifiée (BirA*) fusionnée à une protéine d'intérêt (OGG1 dans notre cas) (Figure 1A), capable de marquer de façon covalente par l'ajout de biotine toute protéine se trouvant dans un

environnement de 10 nm de la protéine d'intérêt (Figure 1B) (Kim and Roux, 2016). Toutes les protéines proches d'OGG1 sont donc biotinylées et peuvent être purifiées grâce à l'affinité de la biotine pour la streptavidine (Figure 1C).

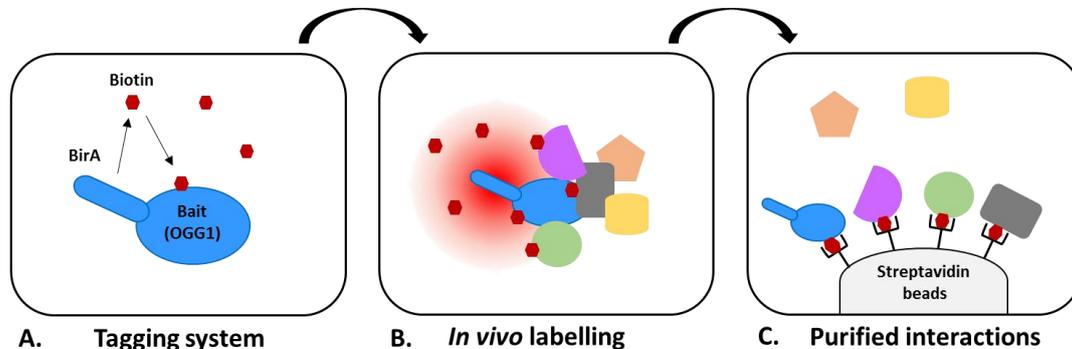


Figure 1 : Principe de la technique de BirA pulldown. A. La protéine d'intérêt (OGG1) est fusionnée avec une forme modifiée de la biotine ligase bactérienne (BirA) qui permet de biotinyler tout composant situé à proximité. B. La protéine de fusion est exprimée dans la cellule. Suite à l'ajout de biotine dans le milieu de culture, la protéine BirA peut marquer avec de la biotine toute protéine située dans un rayon de 10 nm. C. Les protéines biotinylées peuvent finalement être purifiées grâce à des billes couplées à de la streptavidine.

Des cellules Hela ont donc été transfectées par des plasmides codant pour les protéines de fusion OGG1-BirA-NLS ou BirA-NLS. Le jour suivant, les cellules ont été traitées ou non par 40 mM de KBrO_3 pendant 45 min. Le traitement a ensuite été remplacé par du DMEM complet et chaud contenant de la biotine à la concentration finale de 50 μM pendant 5h. Les cellules ont finalement été récupérées, lavées et centrifugées.

Les protéines ont été extraites dans un tampon RIPA (Tris HCl 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, SDS 0.1%, NP40 1%, EDTA 1mM, EGTA 1mM, sodium deoxycholate 0.1%, inhibiteur de protéase 1X, benzonase 0.01 U/ml) pendant 20 min dans la glace (vortex toutes les 5 min), soniquées avec un bain Bioruptor® (5 min de pulses à l'intensité maximale, 30 sec ON / 30 sec OFF), puis centrifugées pendant 20 min à 4°C 14000 rpm. Un pour cent de l'extrait servant d'input a été prélevé. Le reste de l'extrait a été dilué au 1/5 avec du tampon RIPA (sans benzonase). Quarante microlitres de billes couplées à de la streptavidine (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen 11205D) ont été ajoutées à l'extrait dilué, l'ensemble étant incubé sur la nuit à 4°C sur roue. Les billes lavées deux fois 5 min à 4°C sur roue avec du tampon RIPA (sans benzonase) puis deux fois avec du tampon TAP dans les mêmes conditions (Glycérol 10%, NaCl 150mM, HEPES 50mM, EDTA 2mM, NP40 0.1%, inhibiteur de protéase 1X) ont finalement été resuspendues avec 30 μl de Laemmli 2X. Après dénaturation des protéines pendant 15 min à 95°C, les billes ont été éliminées et les échantillons transférés dans un nouveau tube ont été conservés à -20°C avant d'être envoyés pour une analyse par spectrométrie de masse.

Test d'activité enzymatique d'OGG1

Les extraits cellulaires ont été préparés par sonication des culots cellulaires dans un tampon d'extraction contenant 20 mM de Tris-HCl, 250 mM de NaCl et 1mM d'EDTA. Les homogénats ont été centrifugés 30 min à 20 000 g à 4°C et les surnageants ont été dosés puis utilisés pour un test d'activité. Un oligonucléotide de 34 nucléotides contenant une 8-oxoG en position 16 et marquée en son extrémité 5' par un Cy5 fut hybridé à son oligonucléotide complémentaire contenant une cytosine opposée à la lésion. Dans la réaction standard, un mélange d'extraits protéiques (4 µl de volume total) fut ajouté à un « mélange de réaction » de 10 µl contenant 150 fmoles de l'oligonucléotide contenant une 8-oxoG : C, dilué dans un tampon contenant 20 mM de Tris-HCl, 1 mM d'EDTA, 200 mM de NaCl, 1 mg/ml de BSA et 5% de glycérol. Après 1h d'incubation à 37°C, du NaOH (concentration finale de 0.1 N) fut ajouté pour stopper la réaction. Le mélange fut encore incubé 15 min à 37°C avant qu'une solution de dénaturation contenant 80% de formamide soit ajoutée, et que la réaction soit chauffée pendant 5 min à 95°C. Les produits de la réaction ont enfin été déposés sur un gel dénaturant (7M d'urée – 20% de polyacrylamide). Les gels ont été scannés avec un Typhoon (Amersham) et l'intensité des bandes des substrats et des produits clivés ont été quantifiés par le logiciel ImageQuant®. Une réaction contrôle contenant l'oligonucléotide incubé en absence d'extrait protéique est utilisé pour calculer le bruit de fond. Le % de clivage de l'oligonucléotide contenant la 8oxoG est calculé, après soustraction du bruit de fond, selon la formule : % clivage = produit/(produit+substrat)*100.

Inhibiteur de kinase CDK8/CDK19

L'inhibiteur de CDK8/CDK19, la cortistatin A (CA), nous a généreusement été fournie par l'équipe de Henry Efrém Pelish de l'Université de Harvard aux Etats-Unis. Des aliquots nous ont été envoyés à la concentration de 1 mM, conservés dans du DMSO. Une solution intermédiaire de 1 µM a été préparée extemporanément dans du PBS/DMSO 0.1% avant chaque utilisation, puis diluée dans du DMEM complet et chaud à une concentration finale de 100 nM. Les cellules ont été incubées avec cette solution pendant 2h avant le traitement KBrO₃ afin de s'assurer d'une l'inhibition maximale de l'activité kinase. Puis le milieu a été remplacé soit par du DMEM complet soit par la solution de traitement KBrO₃ à 40 mM, contenant toujours le CA à 100 nM pendant 45 min. Les 3 heures de récupération suivant le traitement ont également été faites dans du milieu DMEM complet contenant l'inhibiteur à 100 nM. La présence de CA a été maintenue durant toutes les étapes de l'expérience afin de maintenir une inhibition optimale de l'activité kinase. La suite des traitements était similaire à ce qui a été décrit précédemment.

Cycle cellulaire et transcription

L'analyse du cycle cellulaire a été réalisée grâce à l'utilisation de différents marqueurs spécifiques de certaines phases du cycle : l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) pour marquer la phase S, et le CENPF pour marquer la phase G2. Le protocole de marquage du CENP-F est détaillé dans le paragraphe « Immunofluorescence » ci-dessus. La mesure de la synthèse de

l'ADN par l'EdU (phase S) est une méthode qui consiste à suivre l'incorporation d'un analogue de la thymidine dans l'ADN pendant la synthèse de l'ADN. Cette méthode est basée sur une réaction « click », une réaction covalente catalysée par le cuivre entre un azoture de picolyle et un alcyne. La détection de l'EdU incorporé a été réalisé grâce à l'utilisation du kit « Click-iT® Plus EdU » (Invitrogen, référence C10640), contenant l'ensemble des réactifs nécessaires. L'EdU incorporé dans l'ADN contient un alcyne, et l'Alexa Fluor® 647 ajouté dans un deuxième temps contient l'azoture de picolyle.

L'EdU a été incorporé au milieu de culture à la concentration finale de 50 µM (solution stock à 10 mM) pendant 30 min, juste avant de fixer les cellules (PFA 2% +/- CSK, cf. paragraphe « Stress oxydatifs »). Le protocole de détection de l'EdU (Click-iT® Plus EdU Imaging Kit, Invitrogen C10640) est le suivant :

- Laver les cellules 2 fois avec de la BSA 3% (préparée dans du PBS)
- Perméabiliser avec du PBS-0,5% Triton X100 pendant 20 min à RT
- Préparer FRAIS 1x la solution click-iT « reaction buffer additive » (dilution 1:10 dans l'eau)
- Préparer FRAIS la solution de réaction « Click-iT® Plus reaction cocktail » dans l'ordre suivant en mélangeant bien entre chaque ajout:

NB : les composants « reaction buffer » et « reaction buffer additive » ont tous deux été préparés dans de l'eau.

	Mix X 1 ml
1x Click-iT® reaction buffer (composant D)	880 µl
Copper protectant (composant E)	20 µl
Alexa Fluor® picolyl azide (647) (composant B)	2,5 µl
1x Click-iT® reaction buffer additive (composant F)	100 µl

- Après la perméabilisation, laver 2 fois avec de la BSA 3%
- Ajouter le « Click-iT® Plus reaction cocktail » et incubé pendant 30 min à RT dans le noir
- Laver les cellules une fois avec de la BSA 3%

La détection de l'EdU a directement été suivie par une immunofluorescence permettant de marquer le CENPF, puis d'un marquage au DAPI.

La capacité des cellules à synthétiser de nouveaux ARN, et donc à réaliser le processus de transcription, a pu être suivie grâce à l'utilisation d'un kit similaire à celui utilisé pour l'EdU, excepté que l'on détecte ici l'incorporation de EU (5-ethynyl-uridine). Ce kit (Click-It® RNA Imaging Kit, Invitrogen, référence C10330) permet la détection du EU, un analogue de l'uridine, incorporé dans l'ARN naissant pendant la transcription. La détection ici aussi est basée sur une réaction « click » entre un azide et un alcyne.

L'objectif de cette expérience était de pouvoir suivre l'effet du traitement oxydatif sur la transcription dans les cellules au cours du temps. Les conditions comparées étaient donc les cellules non traitées (NT), K0 (juste après le traitement), K3 (3h après le traitement), et K6 (6 heures après le traitement). Les cellules ont été traitées à des temps différents afin de pouvoir incorporer le EU en même temps pour toutes les conditions. Le EU a donc été ajouté au milieu de culture à la concentration finale de 0,5 mM (solution stock à 0,5 M) pendant 30 min, juste avec la fixation des cellules avec de la PFA 2%. Le protocole de détection du EU (Click-iT® RNA Alexa Fluor® 594 Imaging kit. Invitrogen C10330) est le suivant :

- Perméabiliser avec du PBS-0,5% Triton X100 pendant 15 min à RT
- Préparer FRAIS 1x la solution click-iT « reaction buffer additive » (dilution 1:10 dans l'eau)
- Préparer FRAIS la solution de réaction « Click-iT reaction cocktail » dans l'ordre suivant en mélangeant bien entre chaque ajout :

	Mix X 1 ml
Click-iT® RNA reaction buffer (composant C)	856 µl
CuSO4 (composant D)	40 µl
Alexa Fluor® azide (594) (composant B)	3,7 µl
1x Click-iT® reaction buffer additive (composant E)	100 µl

- Après la perméabilisation, laver avec du PBS
 - Ajouter le « Click-iT reaction cocktail » et incuber pendant 30 min à RT dans le noir
 - Laver les cellules une fois avec du « Click-iT reaction rinse buffer » (composant F)
- Enfin l'ADN des cellules a été marqué au DAPI comme détaillé précédemment.

FLIM-FRET

La technique de FLIM-FRET a été choisie pour explorer la proximité de deux protéines de fusion, OGG1-Halotag et CDK8-GFP, dans des conditions de stress oxydatif ou non. Des cellules Hela ont donc été co-transfectées par le donneur seul (CDK8-GFP) ou le donneur et l'accepteur (OGG1-Halotag), et traitées ou non par du KBrO₃ avant d'être fixées 3h après la fin du traitement. Une partie des cellules ont également été lavées par un tampon CSK avant d'être fixées afin de visualiser la proximité des protéines sur la fraction insoluble.

Le FLIM a été réalisé grâce au module FLIM-FRET du microscope confocal Leica SP8. Les mesures de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) acquises grâce au logiciel SymphoTime® nous ont permis de suivre la demi-vie de fluorescence du donneur (CDK8-GFP) dans chaque condition sur une dizaine de cellules. La moyenne de la demi-vie de fluorescence du fluorophore donneur en absence de l'accepteur a été calculée en appliquant un modèle mono-exponentiel. Celle du donneur en présence de l'accepteur fut calculée avec un modèle bi-exponentiel, en fixant la demi-vie du donneur par la valeur obtenue d'après les mesures

calculées en mono-exponentiel. Afin de calculer les demi-vies de fluorescence, des ROI ont été tracées, chaque ROI correspond au noyau d'une cellule.

Micro-irradiation

La micro-irradiation est basée sur l'utilisation d'un laser 405, réglé à la puissance de 10%. Des régions présélectionnées ont été irradiées sur une distance de 2.5 μm pendant 5 secondes. 5 secondes avant et pendant 1 min après l'irradiation, des séries d'images confocales (1 image/sec) ont été obtenues avec les lasers 488 (pour suivre CDK8-GFP) et 594 (pour suivre OGG1-mcherry). Pour évaluer le recrutement des protéines après irradiation, l'intensité de fluorescence de la région irradiée (zone 1) a été normalisée par l'intensité de fluorescence d'une région non irradiée (zone 2). Toutes les valeurs sont divisées par la moyenne des valeurs mesurés sur les cinq images avant la micro-irradiation (qui est donc de 1) et ce ratio nous permet de suivre l'enrichissement des protéines sur la zone irradiée par rapport à la zone non irradiée. Une dizaine de cellules ont été étudiées de cette façon grâce au logiciel NIS.

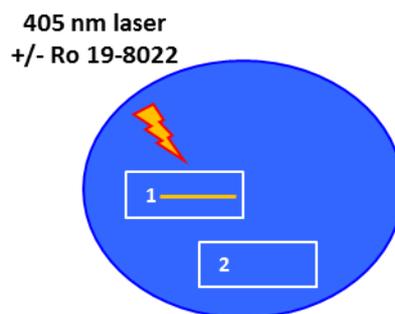


Figure 2 : Illustration des zones nucléaires utilisées pour mesurer l'enrichissement des protéines sur la zone irradiée. La zone 1 correspond à la zone irradiée par un laser 405 sur 2.5 μm . La zone 2 correspond quant à elle à une zone située en dehors de la zone irradiée. Les zones 1 et 2 sont toutes deux situées en dehors de tout nucléole.

Quand indiqué, le photo-sensibilisateur Ro 19-8022 a été ajouté dans le milieu de culture 5 min avant la micro-irradiation, à la concentration finale de 5 μM . Le photo-sensibilisateur nous permet de former localement des dommages oxydatifs de l'ADN. Il a été montré précédemment qu'en absence de ce photo-sensibilisateur, la micro-irradiation avec le laser 405 nm n'induit pas des niveaux détectables de 8-oxoG (Campalans et al., 2013). L'ajout du Ro 19-8022 permet donc de former très majoritairement des dommages de type 8-oxoG, et d'étudier plus spécifiquement les protéines impliquées dans le BER.

Microscopie :

La plupart des images de microscopie ont été acquises à l'aide du microscope confocal Nikon A1 à l'objectif x20 (0.8 NA) ou x60 (1.3 NA) en fonction des expériences. Les expériences de FLIM-FRET ont été réalisées sur un microscope confocal Leica SP8 possédant le module FLIM-FRET et les images ont été acquises à l'objectif x60 (1.3 NA). Pour la

microscopie sur cellules vivantes (expériences de micro-irradiation), le microscope Nikon A1 était équipé d'une chambre thermostatée permettant un bon contrôle de la température et des niveaux de CO₂.

ANALYSES

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7®. Un test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les rangs des médianes entre différentes conditions. Chaque expérience a été reproduite trois fois. Cependant une expérience a été choisie pour représenter les résultats obtenus, lorsque les trois résultats étaient similaires. Les valeurs de chaque cellule ont ainsi été préservées pour l'analyse statistique des données. Le nombre de cellules analysées dans chaque condition est indiqué dans la légende des figures présentées dans la section « Résultats ». Sur tous les diagrammes de dispersion est également représenté l'écart-type. Quand indiqué, les valeurs ont été normalisées par la moyenne obtenue dans la condition contrôle. Cette normalisation a notamment été utilisée pour comparer les valeurs obtenues dans différentes expériences.

Quantification des intensités de fluorescence :

Toutes les intensités de fluorescence ont été quantifiées grâce au logiciel NIS du confocal Nikon. Un marquage au DAPI nous a permis de faire un masque sur le noyau et de quantifier différents paramètres uniquement à l'intérieur de cette limite. Dans le cas du marquage 8-oxoG, le masque sur le noyau était possible grâce au marquage par de l'iodure de propidium.

Quantification du recrutement d'OGG1-GFP en fonction des phases du cycle cellulaire :

Les cellules en phase S et G2 du cycle ont été respectivement marquées par de l'EdU et du CENP-F. Cependant l'incubation avec l'EdU étant de 30 min avant la fixation des cellules, certaines cellules étaient capables d'incorporer l'EdU, mais de rentrer en phase G2 avant la fin du temps d'incubation. Ces cellules étaient donc doublement marquées, par l'EdU et par le CENP-F, et étaient considérées comme de « fausses positives » pour le marquage EdU. Afin de réellement isoler les cellules en réplication, les cellules possédant les deux marquages ont été éliminées de l'analyse. Autrement dit, les cellules dans les différentes phases ont été distinguées de la façon suivante :

- Total des cellules = marquage DAPI
- Cellules en phase G2 = CENP-F
- Cellules en phase S = EdU – CENP-F

- Cellules en phase G1 = DAPI – EdU – CENP-F

Des soustractions des différentes sous-populations ont été réalisées avec le logiciel NIS et l'intensité d'OGG1-GFP a été mesurée dans les noyaux grâce à l'utilisation des masques obtenues par le marquage DAPI comme décrit précédemment.

Analyse des foci 8-oxoG :

Les images ont été acquises à l'objectif x60 en scannant toute l'épaisseur des cellules. Les foci 8-oxoG ont été caractérisés par ImageJ grâce au Plugin « 3D counter object ». Chaque cellule a été isolée, nous permettant de mesurer le nombre de foci par cellule ainsi que le volume des foci. Entre 20 et 50 cellules ont été analysées par condition. La projection maximale des foci présents dans la totalité du volume nucléaire a également été réalisée par ImageJ grâce au menu « Image => Stack => Z project ».

Co-localisation de deux protéines :

L'analyse de la co-localisation de deux protéines a été réalisée grâce au logiciel NIS du confocal Nikon. Le coefficient de Pearson, ou coefficient de corrélation entre deux fluorophores, a été mesuré sur une dizaine de cellules à chaque fois. Des profils de fluorescence ont été réalisés pour certaines expériences (Figures 11 et 12 dans la section « Résultats ») en mesurant l'intensité des différents fluorophores le long de lignes tracées dans le noyau. Les intensités dans chaque canal ont été normalisées par rapport à l'intensité la plus forte (fixée à 1).

Annexes

Annexe 1 : Partenaires d’OGG1 identifiés par la technique de BioID. Tableau présentant les 106 protéines les plus biotinylées par la protéine de fusion OGG1-BirA-NLS dans des cellules traitées au KBrO₃, en comparaison des mêmes cellules non traitées. Le nombre de peptides retrouvés par spectrométrie de masse dans chaque condition (cellules Hela transfectées par les plasmides OGG1-BirA-NLS vs BirA-NLS, traitées ou non par KBrO₃) est donné pour chaque protéine. La dernière colonne correspond à l’analyse décrite dans la section résultats. Les protéines ont été classées par fonction moléculaire et par le processus biologique dans lequel elles interviennent.

Protein	Reference	Molecular function						Biological process						Spectral counts					
														OGG1-BirA-(NT)	OGG1-BirA-(K5)	BirA-(NT)	BirA-(K5)	((OGG1-BirA - BirA) K5) - ((OGG1-BirA - BirA) NT)	
ZCCHV	Q7Z2W4														6	75	0	26	43
ACTA	P62736														0	40	0	0	40
OGG1	O15527														101	129	1	0	29
NONO	Q15233														94	330	5	216	25
RS27A	P62979														21	75	3	32	25
PYC	P11498														8	54	0	25	21
GLYM	P34897														5	26	0	0	21
RBM14	Q96PK6														4	35	0	13	18
ACACA	Q13085														0	23	0	6	17
TIF1B	Q13263														1	26	0	8	17
RPB2	P30876														0	12	0	0	12
PYRG1	P17812														3	32	0	19	10
RTCB	Q9Y310														0	9	0	0	9
ZC11A	O75152														2	21	0	11	8
ASNS	P08243														0	10	0	2	8
TAF9	Q16594														0	8	0	0	8
PSMD1	Q99460														1	8	0	0	7
H1.2	P16403														0	14	2	9	7
PELO	Q9BRX2														0	7	0	0	7
PAR10	Q53GL7														1	8	0	0	7
DYR	P00374														0	7	0	0	7
H2A1B	P04908														0	18	3	14	7
IF2B3	O00425														8	24	0	10	6
DESP	P15924														13	15	14	10	6
VDAC1	P21796														3	8	1	0	6
PP1B	P62140														0	6	0	0	6
PPIA	P62937														6	15	0	3	6
PSMD4	P55036														0	7	0	1	6
VATA	P38606														0	7	0	1	6
RECQ1	P46063														0	7	0	1	6
IMA1	P52292														0	6	0	0	6
EZRI	P15311														0	6	0	0	6
FHL2	Q14192														0	6	0	0	6
G3P	P04406														18	41	4	22	5
TCPZ	P40227														3	10	0	2	5
PDLI5	Q96HC4														0	9	0	4	5
RBM4	Q9BWF3														1	7	0	1	5
MGAP	Q81W19														0	6	0	1	5
TES	Q9UGI8														0	5	0	0	5
RLA0	P05388														0	5	0	0	5
ATRX	P46100														0	5	0	0	5
TRIP6	Q15654														0	6	0	1	5
IF2G	P41091														0	5	0	0	5
ENOG	P09104														0	5	0	0	5
HSP72	P54652														23	27	0	0	4
ROA0	Q13151														5	15	0	6	4
PHB2	Q99623														3	9	0	2	4
MCM7	P33993														0	7	0	3	4
DDX1	Q92499														1	8	0	3	4
MDHM	P40926														4	8	0	0	4
HP1B3	Q5SSJ5														0	6	0	2	4
TAF9B	Q9HBM6														1	7	0	2	4

Protein	Reference	Molecular function						Biological process						Spectral counts						
		Grey	Purple	Magenta	Light Green	Cyan	Dark Green	Blue	Grey	Yellow	Purple	Brown	Red	Green	Light Blue	Magenta	OGG1-BirA-(NT)	OGG1-BirA-(K5)	BirA-(NT)	BirA-(K5)
PGAM1	P18669															1	7	0	2	4
GCR	P04150															0	5	0	1	4
H2A1D	P20671															0	18	0	14	4
CLIC1	O00299															0	5	0	1	4
TSY	P04818															0	4	0	0	4
SIR1	Q96EB6															0	5	0	1	4
UBP48	Q86UV5															0	4	0	0	4
UHRF1	Q96T88															0	4	0	0	4
DSG1	Q02413															0	0	4	0	4
RN219	Q5W0B1															0	4	0	0	4
MGMT	P16455															0	4	0	0	4
PSPC1	Q8WXF1															0	7	0	3	4
THOC3	Q96J01															0	4	0	0	4
ATPA	P25705															21	26	3	5	3
MATR3	P43243															7	29	0	19	3
IF4A1	P60842															5	26	1	19	3
PARP1	P09874															2	11	0	6	3
HSPB1	P04792															11	16	1	3	3
ALBU	P02768															18	22	23	24	3
ZC3HE	Q6PJT7															0	6	0	3	3
ROA3	P51991															2	11	0	6	3
LPPRC	P42704															0	5	0	2	3
EMSY	Q72589															1	5	0	1	3
BYST	Q13895															1	5	0	1	3
PSA5	P28066															2	5	0	0	3
TFCP2	Q12800															0	4	0	1	3
FUBP1	Q96AE4															0	4	0	1	3
HSP74	P34932															1	4	0	0	3
TRI33	Q9UPN9															0	4	0	1	3
CH10	P61604															1	3	1	0	3
CDK2	P24941															0	3	0	0	3
BAZ1B	Q9UIG0															1	5	0	1	3
EIF3I	Q13347															0	3	0	0	3
AMPL	P28838															0	3	0	0	3
RIC8A	Q9NPQ8															0	3	0	0	3
SDHA	P31040															0	3	0	0	3
H2AY	O75367															0	3	0	0	3
ETFB	P38117															0	3	0	0	3
ATPO	P48047															0	3	0	0	3
AGFG1	P52594															0	3	0	0	3
YTHD2	Q9Y5A9															0	3	0	0	3
RS10	P46783															0	3	1	1	3
UBP5	P45974															0	3	0	0	3
SYNEM	O15061															0	3	0	0	3
AAAS	Q9NRG9															0	3	0	0	3
ETFA	P13804															0	3	0	0	3
STOM	P27105															0	3	0	0	3
PRS6A	P17980															0	3	0	0	3
PIAS2	O75928															0	3	0	0	3
SUMO4	Q6EEV6															0	3	0	0	3
SENP3	Q9H4L4															0	3	0	0	3
1433G	P61981															0	3	0	0	3
1433B	P31946															0	3	0	0	3
DVL1	O14640															0	3	0	0	3

Annexe 2 : Liste des siRNAs Qiagen utilisés. Le gène cible, la référence Qiagen ainsi que la séquences sont donnés pour chaque siRNA.

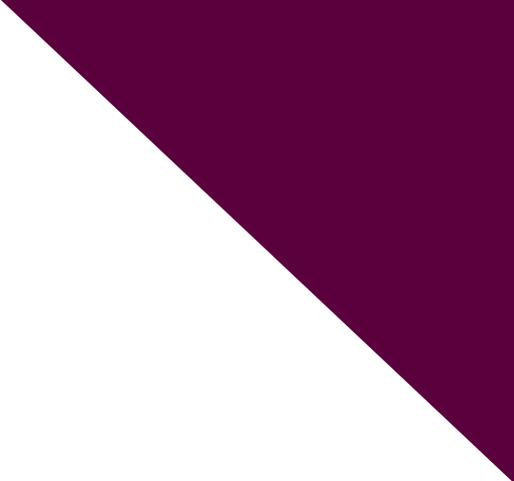
Gène cible	Référence Qiagen	Séquence (de 5' en 3')
Contrôle	SI03650318	
MED12	SI00072660	CACCCAAACCCTGGTCTATA
MED12L	SI04276706	CTCGAGGAGATTTGTCAGTCA
MED13	SI03083577	CCTGTCGATTAGGTCAACATA
MED13L	SI02641443	ATGGCTTAAATGGGACGCTAA
CDK8	SI00024402	TTCGAGAGCTTAAGCATCCAA
CDK19	SI02224621	CACTGTCGTCAGGAAGATATA
Cycline C	SI00073507	CAAGTACCGTATATTGATTTA
MED14	SI00061327	CGGGTGAAGTTTCGTGTTGAA
SMC3	SI02654281	GAGGACTAAGTTGGAGCTTAA

Annexe 3 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence. Le nom de la protéine cible, la référence de l'anticorps ainsi que l'espèce de l'hôte et la dilution à laquelle l'anticorps a été utilisé sont donnés pour chaque anticorps.

Cible	Référence	Espèce	Dilution
8-oxoguanine	ab48058 (abcam)	Souris	1/2000
SMC3	ab128919 (abcam)	Lapin	1/500
CTCF	ab128873 (abcam)	Lapin	1/500
CENP-F	ab5 (abcam)	Lapin	1/500
SMC1 phospho-S967	ab81306 (abcam)	Lapin	1/500

Annexe 4 : Liste des anticorps primaires utilisés en western blot et pour les expériences d'immunoprécipitation. Le nom de la protéine cible, la référence de l'anticorps ainsi que l'espèce de l'hôte et la dilution à laquelle l'anticorps a été utilisé sont donnés pour chaque anticorps. La taille attendue d'après le fournisseur est également indiquée. Les anticorps utilisés pour les expériences d'immunoprécipitation sont notés d'une étoile (*) à côté du nom de la protéine.

Cible	Référence	Espèce	Dilution	Taille attendue
OGG1	ab124741 (abcam)	Lapin	1/1 000	65 kDa
RAD21	ab992 (abcam)	Lapin	1/1 000	110 kDa
SMC3	ab128919 (abcam)	Lapin	1/1 000	141 kDa
SMC1*	ab21583 (abcam)	Lapin	1/1 000	143 kDa
SMC1 phospho-S966	ab81306 (abcam)	Lapin	1/500	143 kDa
CTCF	ab128873 (abcam)	Lapin	1/1 000	83 kDa
MED14	ab72141 (abcam)	Lapin	1/1 000	160 kDa
MED12*	ab70842 (abcam)	Lapin	1/1 000	227 kDa
MED12L	orb185551 (Gentaur)	Lapin	1/500	240 kDa
MED13*	ab49468 (abcam)	Lapin	1/1 000	300 kDa
MED13L	ab87831 (abcam)	Lapin	1/5 000	243 kDa
CDK8*	Sc-13155 (santa-cruz)	Souris	1/100	53 kDa
CDK19	HPA007053 (Sigma)	Lapin	1/500	57 kDa
Cycline C	ab85927 (abcam)	Lapin	1/5 000	33 kDa
STAT1 phospho-S727	9177S (Cell Signaling)	Lapin	1/1 000	91 kDa
HP1 α	2Hp-2G9-AS (Euromedex)	Souris	1/5 000	26 kDa
H3	39763 (Active Motif)	Souris	1/5 000	17 kDa
Lamine B1	ab20396 (abcam)	Souris	1/1 000	66 kDa



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbotts, R., and S. Madhusudan. 2010. Human AP endonuclease 1 (APE1): From mechanistic insights to druggable target in cancer. *Cancer Treat. Rev.* 36:425–435. doi:10.1016/j.ctrv.2009.12.006.
- Abbotts, R., and D.M. Wilson. 2017. Coordination of DNA single strand break repair. *Free Radic. Biol. Med.* 107:228–244. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039.
- Adegbola, A., L. Musante, B. Callewaert, P. Maciel, H. Hu, B. Isidor, S. Picker-Minh, C. Le Caignec, B.D. Chiaie, O. Vanakker, B. Menten, A. Dheedene, N. Bockaert, F. Roelens, K. Decaestecker, J. Silva, G. Soares, F. Lopes, H. Najmabadi, K. Kahrizi, G.F. Cox, S.P. Angus, J.F. Staropoli, U. Fischer, V. Suckow, O. Bartsch, A. Chess, H.H. Ropers, T.F. Wienker, C. Hübner, A.M. Kaindl, and V.M. Kalscheuer. 2015. Redefining the MED13L syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 23:1308–1317. doi:10.1038/ejhg.2015.26.
- Adelman, K., and J. Lis. 2012. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles on metazoans. *Nat. Rev. Genet.* 13:720–731. doi:10.1038/nrg3293.Promoter-proximal.
- Akoulitchev, S., S. Chuikov, and D. Reinberg. 2000. TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature.* 407:102–106. doi:10.1038/35024111.
- Alderson, N.L., Y. Wang, M. Blatnik, N. Frizzell, M.D. Walla, T.J. Lyons, N. Alt, J.A. Carson, R. Nagai, S.R. Thorpe, and J.W. Baynes. 2006. S-(2-Succinyl)cysteine: A novel chemical modification of tissue proteins by a Krebs cycle intermediate. *Arch. Biochem. Biophys.* 450:1–8. doi:10.1016/j.abb.2006.03.005.
- Allen, B.L., and D.J. Taatjes. 2015. The Mediator complex: A central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16:155–166. doi:10.1038/nrm3951.
- Amouroux, R., A. Campalans, B. Epe, and J.P. Radicella. 2010. Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res.* 38:2878–2890. doi:10.1093/nar/gkp1247.
- Antoniali, G., L. Lirussi, C. D'Ambrosio, F. Dal Piaz, C. Vascotto, E. Casarano, D. Marasco, A. Scaloni, F. Fogolari, and G. Tell. 2014. SIRT1 gene expression upon genotoxic damage is regulated by APE1 through nCaRE-promoter elements. *Mol. Biol. Cell.* 25:532–547. doi:10.1091/mbc.E13-05-0286.
- Aragon, L., E. Martinez-Perez, and M. Merckenschlager. 2013. Condensin, cohesin and the control of chromatin states. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23:204–211. doi:10.1016/j.gde.2012.11.004.
- Arai, T., V.P. Kelly, O. Minowa, T. Noda, and S. Nishimura. 2002. High accumulation of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, in Mmh / Ogg1 deficient mice by chronic oxidative stress. *Carcinogenesis.* 23:2005–2010. doi:10.1093/carcin/23.12.2005.
- Arai, T., V.P. Kelly, O. Minowa, T. Noda, and S. Nishimura. 2006. The study using wild-type and Ogg1 knockout mice exposed to potassium bromate shows no tumor induction despite an extensive accumulation of 8-hydroxyguanine in kidney DNA. *Toxicology.* 221:179–186. doi:10.1016/j.tox.2006.01.004.
- Arents, G., and E.N. Moudrianakis. 1995. The histone fold: A ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:11170–11174. doi:10.1073/pnas.92.24.11170.
- Audebert, M., S. Chevillard, C. Levalois, G. Gyapay, A. Vieillefond, J. Klijanienko, P. Vielh, A.K. El Naggar, S. Oudard, S. Boiteux, and J.P. Radicella. 2000. Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res.* 60:4740–4744.

- Ballmaier, D., and B. Epe. 2006. DNA damage by bromate: Mechanism and consequences. *Toxicology*. 221:166–171. doi:10.1016/j.tox.2006.01.009.
- Bancerek, J., Z.C. Poss, I. Steinparzer, V. Sedlyarov, T. Pfaffenwimmer, I. Mikulic, L. Dölken, B. Strobl, M. Müller, D.J. Taatjes, and P. Kovarik. 2013. CDK8 Kinase Phosphorylates Transcription Factor STAT1 to Selectively Regulate the Interferon Response. *Immunity*. 38:250–262. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.017.
- Barbieri, C., S. Baca, M. Lawrence, F. Demichelis, M. Blattner, J. Theurillat, T. White, P. Stojanov, E. Van Allen, N. Stransky, E. Nickerson, S. Chae, G. Boysen, D. Auclair, R. Onofrio, K. Park, N. Kitabayashi, T. MacDonald, K. Sheikh, T. Vuong, C. Guiducci, K. Cibulskis, A. Sivachenko, S. Carter, G. Saksena, D. Voet, W. Hussain, A. Ramos, W. Winckler, M. Redman, K. Ardlie, A. Tewari, J. Mosquera, N. Rupp, P. Wild, H. Moch, C. Morrissey, P. Nelson, P. Kantoff, S. Gabriel, T. Golub, M. Meyerson, E. Lander, G. Getz, M. Rubin, and L. Garraway. 2012. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat. Genet.* 44:685–689. doi:10.1038/ng.2279.Exome.
- Barrington, C., R. Finn, and S. Hadjur. 2017. Cohesin biology meets the loop extrusion model. *Chromosom. Res.* 25:51–60. doi:10.1007/s10577-017-9550-3.
- Bauer, N.C., A.H. Corbett, and P.W. Doetsch. 2015. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res.* 43:10083–10101. doi:10.1093/nar/gkv1136.
- Baumann, M., J. Pontiller, and W. Ernst. 2010. Structure and basal transcription complex of RNA Polymerase II core promoters in the mammalian genome: An overview. *Mol. Biotechnol.* 45:241–247. doi:10.1007/s12033-010-9265-6.
- Bednar, J., R.A. Horowitz, S.A. Grigoryev, L.M. Carruthers, J.C. Hansen, A.J. Koster, and C.L. Woodcock. 1998. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:14173–14178. doi:10.1073/pnas.95.24.14173.
- Bhakat, K.K., S.K. Mokkapati, I. Boldogh, T.K. Hazra, and S. Mitra. 2006. Acetylation of Human 8-Oxoguanine-DNA Glycosylase by p300 and Its Role in 8-Oxoguanine Repair In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 26:1654–1665. doi:10.1128/MCB.26.5.1654-1665.2006.
- Birben, E., U. Murat, S. Md, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. Kalayci. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J.* 5:9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- Biterge, B., and R. Schneider. 2014. Histone variants: Key players of chromatin. *Cell Tissue Res.* 356:457–466. doi:10.1007/s00441-014-1862-4.
- Bjørås, M., E. Seeberg, L. Luna, L.H. Pearl, and T.E. Barrett. 2002. Reciprocal “flipping” underlies substrate recognition and catalytic activation by the human 8-oxo-guanine DNA glycosylase. *J. Mol. Biol.* 317:171–177. doi:10.1006/jmbi.2002.5400.
- Blahnik, K.R., L. Dou, L. Echipare, S. Iyengar, H. O’Geen, E. Sanchez, Y. Zhao, M.A. Marra, M. Hirst, J.F. Costello, I. Korf, and P.J. Farnham. 2011. Characterization of the Contradictory Chromatin Signatures at the 3’ exons of Zinc finger genes. *PLoS One.* 6:e17121. doi:10.1371/journal.pone.0017121.
- Blainey, P.C., A.M. van Oijen, A. Banerjee, G.L. Verdine, and X.S. Xie. 2006. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:5752–5757. doi:10.1073/pnas.0509723103.

- Blons, H., J.P. Radicella, O. Laccourreye, D. Brasnu, P. Beaune, S. Boiteux, and P. Laurent-Puig. 1999. Frequent allelic loss at chromosome 3p distinct from genetic alterations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 gene in head and neck cancer. *Mol. Carcinog.* 26:254–260. doi:10.1002/(SICI)1098-2744(199912)26:4<254::AID-MC4>3.0.CO;2-D.
- Bobba, A., G. Amadoro, D. Valenti, V. Corsetti, R. Lassandro, and A. Atlante. 2013. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion.* 13:298–311. doi:10.1016/j.mito.2013.03.008.
- Boeing, S., C. Rigault, M. Heidemann, D. Eick, and M. Meisterernst. 2010. RNA polymerase II C-terminal heptarepeat domain Ser-7 phosphorylation is established in a mediator-dependent fashion. *J. Biol. Chem.* 285:188–196. doi:10.1074/jbc.M109.046565.
- Boiteux, S., F. Coste, and B. Castaing. 2017. Repair of 8-oxo-7, 8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells : Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Radic. Biol. Med.* 107:179–201.
- Boiteux, S., and J.P. Radicella. 1999. Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie.* 81:59–67. doi:10.1016/S0300-9084(99)80039-X.
- Bourbon, H.-M. 2008. Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Res.* 36:3993–4008. doi:10.1093/nar/gkn349.
- Bravard, A., M. Vacher, B. Gouget, A. Coutant, F.H. de Boisferon, S. Marsin, S. Chevillard, and J.P. Radicella. 2006. Redox Regulation of Human OGG1 Activity in Response to Cellular Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* 26:7430–7436. doi:10.1128/MCB.00624-06.
- Bravard, A., M. Vacher, E. Moritz, L. Vaslin, J. Hall, B. Epe, and J.P. Radicella. 2009. Oxidation status of human ogg1-s326c polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res.* 69:3642–3649. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3943.
- Brem, R., and J. Hall. 2005. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res.* 33:2512–2520. doi:10.1093/nar/gki543.
- Brooker, A., and K. Berkowitz. 2014. The roles of cohesins in mitosis, meiosis, and human health and disease. *Methods Mol Biol.* 1170:229–66.
- Bruner, S.D., D.P.G. Norman, and G.L. Verdine. 2000. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature.* 403:859–866. doi:10.1038/35002510.
- Budworth, H., F.R. Harris, P. Williams, D.Y. Lee, A. Holt, J. Pahnke, B. Szczesny, K. Acevedo-Torres, S. Ayala-Peña, and C.T. McMurray. 2015. Suppression of Somatic Expansion Delays the Onset of Pathophysiology in a Mouse Model of Huntington’s Disease. *PLoS Genet.* 11:1–22. doi:10.1371/journal.pgen.1005267.
- Bukowska, B., and B.T. Karwowski. 2018. Actual state of knowledge in the field of diseases related with defective nucleotide excision repair. *Life Sci.* 195:6–18. doi:10.1016/j.lfs.2017.12.035.
- Bunting, S.F., and A. Nussenzweig. 2013. End-joining, translocations and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 13:443–454. doi:10.1038/nrc3537.
- Burgess, R.C., B. Burman, M.J. Kruhlak, and T. Misteli. 2014. Activation of DNA Damage Response Signaling by Condensed Chromatin. *Cell Rep.* 9:1703–1718. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.060.

- Busslinger, G.A., R.R. Stocsits, P. Van Der Lelij, E. Axelsson, A. Tedeschi, N. Galjart, and J.M. Peters. 2017. Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature*. 544:503–507. doi:10.1038/nature22063.
- Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J.P. Pouget, J.L. Ravanat, and S. Sauvaigo. 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 424:9–21. doi:10.1016/S0027-5107(99)00004-4.
- Caldecott, K.W. 2003a. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. 2:955–969. doi:10.1016/S1568-7864(03)00118-6.
- Caldecott, K.W. 2003b. DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia. *Cell*. 112:7–10. doi:10.1016/S0092-8674(02)01247-3.
- Caldecott, K.W. 2014. DNA single-strand break repair. *Exp. Cell Res.* 329:2–8. doi:10.1016/j.yexcr.2014.08.027.
- Caldecott, K.W., C.K. McKeown, J.D. Tucker, S. Ljungquist, and L.H. Thompson. 1994. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol. Cell. Biol.* 14:68–76. doi:10.1128/MCB.14.1.68.Updated.
- Campalans, A., R. Amouroux, A. Bravard, B. Epe, and J.P. Radicella. 2007. UVA irradiation induces relocalisation of the DNA repair protein hOGG1 to nuclear speckles. *J. Cell Sci.* 120:23–32. doi:10.1242/jcs.03312.
- Campalans, A., T. Kortulewski, R. Amouroux, H. Menoni, W. Vermeulen, and J.P. Radicella. 2013. Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair. *Nucleic Acids Res.* 41:3115–3129. doi:10.1093/nar/gkt025.
- Campalans, A., S. Marsin, Y. Nakabeppu, T.R. O'Connor, S. Boiteux, and J.P. Radicella. 2005. XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: A model for its recruitment to base excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 4:826–835. doi:10.1016/j.dnarep.2005.04.014.
- Campalans, A., E. Moritz, T. Kortulewski, D. Biard, B. Epe, and J.P. Radicella. 2015. Interaction with OGG1 Is Required for Efficient Recruitment of XRCC1 to Base Excision Repair and Maintenance of Genetic Stability after Exposure to Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* 35:1648–1658. doi:10.1128/MCB.00134-15.
- Canudas, S., and S. Smith. 2009. Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *J. Cell Biol.* 187:165–173. doi:10.1083/jcb.200903096.
- Cevhler, M., Y. Shi, D. Li, C. BT, S. Malik, and R. Roeder. 2014. Reconstitution of active human core Mediator complex reveals a pivotal role of the MED14 subunit. *Nat Struct Mol Biol.* 21:1028–1034. doi:10.1038/nsmb.2914.
- Chao, W.C.H., Y. Murayama, S. Muñoz, A. Costa, F. Uhlmann, and M.R. Singleton. 2015. Structural Studies Reveal the Functional Modularity of the Scc2-Scc4 Cohesin Loader. *Cell Rep.* 12:719–725. doi:10.1016/j.celrep.2015.06.071.
- Charles Richard, J.L., M.S. Shukla, H. Menoni, K. Ouararhni, I.N. Lone, Y. Roulland, C. Papin, E. Ben Simon, T. Kundu, A. Hamiche, D. Angelov, and S. Dimitrov. 2016. FACT Assists Base Excision Repair by Boosting the Remodeling Activity of RSC. *PLoS Genet.* 12:1–21. doi:10.1371/journal.pgen.1006221.

- Charlet-Berguerand, N., S. Feuerhahn, S.E. Kong, H. Ziserman, J.W. Conaway, R. Conaway, and J.M. Egly. 2006. RNA polymerase II bypass of oxidative DNA damage is regulated by transcription elongation factors. *EMBO J.* 25:5481–5491. doi:10.1038/sj.emboj.7601403.
- Chen, L., A. Elahi, J. Pow-Sang, P. Lazarus, and J. Park. 2003. Association between polymorphism of human oxoguanine glycosylase 1 and risk of prostate cancer. *J Urol.* 170:2471–4.
- Chevillard, S., J.P. Radicella, C. Levalois, J. Lebeau, M.F. Poupon, S. Oudard, B. Dutrillaux, and S. Boiteux. 1998. Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene.* 16:3083–6. doi:10.1038/sj.onc.1202096.
- Chiang, T., F. Duncan, K. Schindler, R. Schultz, and M. Lampson. 2010. Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Curr. Biol.* 20:1522–8.
- Chien, R., W. Zeng, S. Kawauchi, M.A. Bender, R. Santos, H.C. Gregson, J.A. Schmiesing, D.A. Newkirk, X. Kong, A.R. Ball, A.L. Calof, A.D. Lander, M.T. Groudine, and K. Yokomori. 2011. Cohesin mediates chromatin interactions that regulate mammalian β -globin expression. *J. Biol. Chem.* 286:17870–17878. doi:10.1074/jbc.M110.207365.
- Chrun, E.S., F. Modolo, and F.I. Daniel. 2017. Histone modifications: A review about the presence of this epigenetic phenomenon in carcinogenesis. *Pathol. Res. Pract.* 213:1329–1339. doi:10.1016/j.prp.2017.06.013.
- Church, D.F., and W.A. Pryor. 1985. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* 64:111–126. doi:10.1289/ehp.8564111.
- Ciccia, A., and S.J. Elledge. 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell.* 40:179–204. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019.The.
- Clark, A., M. Oldenbroek, and T. Boyer. 2015. Mediator kinase module and human tumorigenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 50:393–426. doi:10.3109/10409238.2015.1064854.
- Coin, F., and J.-M. Égly. 2000. Formation du complexe d'initiation de la transcription: Des facteurs généraux aux complexes qui destabilisent la chromatine. *Medecine/Sciences.* 16:593–601.
- Conaway, R.C., and J.W. Conaway. 2011. Function and regulation of the Mediator complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21:225–230. doi:10.1016/j.gde.2011.01.013.
- Cosma, M.P. 2002. Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol. Cell.* 10:227–36. doi:10.1016/S1097-2765(02)00604-4.
- Courilleau, C., C. Chailleux, A. Jauneau, F. Grima, S. Briois, E. Boutet-Robinet, F. Boudsocq, D. Trouche, and Y. Canitrot. 2012. The chromatin remodeler p400 atpase facilitates RAD51-mediated repair of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 199:1067–1081. doi:10.1083/jcb.201205059.
- Cracowski, J.L. 2004. Les isoprostanes: un rôle physiopathologique potentiel en pathologie vasculaire. *Rev. Med. Interne.* 25:459–463. doi:10.1016/j.revmed.2004.02.022.
- Craig, J.M. 2005. Heterochromatin - Many flavours, common themes. *BioEssays.* 27:17–28. doi:10.1002/bies.20145.
- Cucco, F., A. Servadio, V. Gatti, P. Bianchi, L. Mannini, A. Prodosmo, E. De Vitis, G. Basso, A. Friuli, L. Laghi, S. Soddu, G. Fontanini, and A. Musio. 2014. Mutant cohesin drives chromosomal instability in early colorectal adenomas. *Hum. Mol. Genet.* 23:6773–6778. doi:10.1093/hmg/ddu394.

- D'Errico, M., E. Parlanti, M. Teson, B.M.B. de Jesus, P. Degan, A. Calcagnile, P. Jaruga, M. Bjørås, M. Crescenzi, A.M. Pedrini, J.-M. Egly, G. Zambruno, M. Stefanini, M. Dizdaroglu, and E. Dogliotti. 2006. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J.* 25:4305–4315. doi:10.1038/sj.emboj.7601277.
- Dahmus, M.E. 1996. Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 271:19009–19012. doi:10.1074/jbc.271.32.19009.
- Dalhus, B., M. Forsbring, I.H. Helle, E.S. Vik, R.J. Forstrøm, P.H. Backe, I. Alseth, and M. Bjørås. 2011. Separation-of-function mutants unravel the dual-reaction mode of human 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Structure.* 19:117–127. doi:10.1016/j.str.2010.09.023.
- Daniels, D., M. Ford, M. Schwinn, H. Benink, M. Galbraith, R. Amunugama, R. Jones, D. Allen, N. Okazaki, H. Yamakawa, F. Miki, T. Nagase, J. Espinosa, and M. Urh. 2013. Mutual Exclusivity of MED12/MED12L, MED13/13L, and CDK8/19 Paralogs Revealed within the CDK-Mediator Kinase Module. *J. Proteomics Bioinform.* 1:2–7. doi:10.4172/jpb.S2-004.
- Dantzer, F., L. Luna, M. Bjørås, and E. Seeberg. 2002. Human OGG1 undergoes serine phosphorylation and associates with the nuclear matrix and mitotic chromatin in vivo. *Nucleic Acids Res.* 30:2349–57.
- David, S.S., V.L. O'Shea, and S. Kundu. 2007. Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage. *Nature.* 447:941–950. doi:10.1038/nature05978.
- Davidovic, L., M. Vodenicharov, E.B. Affar, and G.G. Poirier. 2001. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp. Cell Res.* 268:7–13. doi:10.1006/excr.2001.5263.
- Davidson, I.F., D. Goetz, M.P. Zaczek, M.I. Molodtsov, P.J. Huis in 't Veld, F. Weissmann, G. Litos, D.A. Cisneros, M. Ocampo-Hafalla, R. Ladurner, F. Uhlmann, A. Vaziri, and J. Peters. 2016. Rapid movement and transcriptional re-localization of human cohesin on DNA. *EMBO J.* 35:2671–2685. doi:10.15252/embj.201695402.
- Davis, M.A., E.A. Larimore, B.M. Fissel, J. Swanger, D.J. Taatjes, and B.E. Clurman. 2013. The SCF-Fbw7 ubiquitin ligase degrades MED13 and MED13L and regulates CDK8 module association with Mediator. *Genes Dev.* 27:151–156. doi:10.1101/gad.207720.112.
- Dellaire, G., and D.P. Bazett-Jones. 2004. PML nuclear bodies: Dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *BioEssays.* 26:963–977. doi:10.1002/bies.20089.
- Dellaire, G., R.W. Ching, K. Ahmed, F. Jalali, K.C.K. Tse, R.G. Bristow, and D.P. Bazett-Jones. 2006. Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *J. Cell Biol.* 175:55–66. doi:10.1083/jcb.200604009.
- Demple, B., T. Herman, and D.S. Chen. 1991. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:11450–11454. doi:10.1073/pnas.88.24.11450.
- Dherin, C., J.P. Radicella, M. Dizdaroglu, and S. Boiteux. 1999. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human α -hOgg1 protein and the polymorphic α -hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res.* 27:4001–4007. doi:10.1093/nar/27.20.4001.
- Dianova, I.I., K.M. Sleeth, S.L. Allinson, J.L. Parsons, C. Breslin, K.W. Caldecott, and G.L. Dianov. 2004. XRCC1-DNA polymerase β interaction is required for efficient base excision repair. *Nucleic*

- Acids Res.* 32:2550–2555. doi:10.1093/nar/gkh567.
- Dinant, C., G. Ampatzidis-Michailidis, H. Lans, M. Tresini, A. Lagarou, M. Grosbart, A.F. Theil, W.A. vanCappellen, H. Kimura, J. Bartek, M. Fousteri, A.B. Houtsmuller, W. Vermeulen, and J.A. Marteijn. 2013. Enhanced chromatin dynamics by fact promotes transcriptional restart after UV-induced DNA damage. *Mol. Cell.* 51:469–479. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.007.
- Ding, Y., A.M. Fleming, and C.J. Burrows. 2017. Sequencing the Mouse Genome for the Oxidatively Modified Base 8-Oxo-7,8-dihydroguanine by OG-Seq. *J. Am. Chem. Soc.* 139:2569–2572. doi:10.1021/jacs.6b12604.
- Dion, M.F., S.J. Altschuler, L.F. Wu, and O.J. Rando. 2005. Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:5501–5506. doi:10.1073/pnas.0500136102.
- Dixon, J., S. Selvaraj, F. Yue, A. Kim, Y. Li, Y. Shen, M. Hu, J. Liu, and B. Ren. 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature.* 485:376–80.
- Dizdaroglu, M. 2012. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett.* 327:26–47. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.016.
- Donner, A.J., C.C. Ebmeier, D.J. Taatjes, and J.M. Espinosa. 2010. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nat Struc.* 17:194–201. doi:10.1038/nsmb.1752.CDK8.
- Dorsett, D., and L. Ström. 2012. The ancient and evolving roles of cohesin in DNA repair and gene expression. *Curr Biol.* 22:240–250. doi:10.1016/j.cub.2012.02.046.The.
- Dröge, W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82:47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
- Drohat, A., and A. Maiti. 2014. Mechanisms for enzymatic cleavage of the N-glycosidic bond in DNA. *Org Biomol Chem.* 12:8367–8378. doi:10.1021/jacs.5b07154.Total.
- Dubois, M.F., V.T. Nguyen, S. Bellier, and O. Bensaude. 1994. Inhibitors of transcription such as 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole and isoquinoline sulfonamide derivatives (H-8 and H-7*) promote dephosphorylation of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II largest subunit. *J. Biol. Chem.* 269:13331–13336.
- Dujardin, G., É. Daguene, D.G. Bernard, M. Flodrops, S. Durand, A. Chauveau, F. El Khoury, C. Le Jossic-Corcos, and L. Corcos. 2016. L'épissage des ARN pré-messagers: quand le splicéosome perd pied. *Medecine/Sciences.* 32:1103–1110. doi:10.1051/medsci/20163212014.
- Dvir, A., R.C. Conaway, and J.W. Conaway. 1997. A role for TFIIF in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:9006–9010. doi:10.1073/pnas.94.17.9006.
- Ebmeier, C.C., and D.J. Taatjes. 2010. Activator-Mediator binding regulates Mediator-cofactor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:11283–11288. doi:10.1073/pnas.0914215107.
- Elahi, A., Z. Zheng, J. Park, K. Eyring, T. McCaffrey, and P. Lazarus. 2002. The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis.* 23:1229–1234. doi:10.1093/carcin/23.7.1229.

- Elmlund, H., V. Baraznenok, M. Lindahl, C.O. Samuelson, P.J.B. Koeck, S. Holmberg, H. Hebert, and C.M. Gustafsson. 2006. The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:15788–93. doi:10.1073/pnas.0607483103.
- Esnault, C., Y. Ghavi-Helm, S. Brun, J. Soutourina, N. Van Berkum, C. Boschiero, F. Holstege, M. Werner. 2008. Mediator-dependant recruitment of TFIID modules in preinitiation complex. *Mol Cell.* 31:337-346. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.021.
- Eyboulet, F., C. Cibot, T. Eychenne, H. Neil, O. Alibert, M. Werner, and J. Soutourina. 2013. Mediator links transcription and DNA repair by facilitating Rad2 / XPG recruitment. *Genes Dev.* 27:2549–62. doi:10.1101/gad.225813.113.
- Eychenne, T., M. Werner, and J. Soutourina. 2017. Toward understanding of the mechanisms of Mediator function in vivo : Focus on the preinitiation complex assembly. *Transcription.* 8:328–342. doi:10.1080/21541264.2017.1329000.
- Farinati, F., R. Cardin, M. Bortolami, D. Nitti, D. Basso, M. De Bernard, M. Cassaro, A. Sergio, and M. Ruge. 2008. Oxidative DNA damage in gastric cancer: CagA status and OGG1 gene polymorphism. *Int. J. Cancer.* 123:51–55. doi:10.1002/ijc.23473.
- Favier, A. 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual. Chim.* 108–115.
- Featherstone, M. 2002. Coactivators in transcription initiation: Here are your orders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:149–155.
- Felsenfeld, G., and M. Groudine. 2003. Controlling the double helix. *Nature.* 421:448–453.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Lee, M. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2004. H2AX: The histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst).* 3:959–967. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.024.
- Firestein, R., A.J. Bass, S.Y. Kim, I.F. Dunn, J. Silver, I. Guney, E. Freed, A.H. Ligon, N. Vena, S. Ogino, G. Chheda, P. Tamayo, S. Finn, Y. Shrestha, S. Jesse, S. Jain, E. Bojarski, C. Mermel, J. Barretina, A. Chan, J. Baselga, J. Tabernero, D.E. Root, C.S. Fuchs, R. a Shivdasani, M. Meyerson, and W.C. Hahn. 2008. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature.* 455:547–551. doi:10.1038/nature07179.
- Flanagan, P.M., R.J. Kelleher, M.H. Sayre, H. Tschochner, and R.D. Kornberg. 1991. A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature.* 350:436–438. doi:10.1038/350436a0.
- Fleming, A.M., Y. Ding, and C.J. Burrows. 2017. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114:2604–2609. doi:10.1073/pnas.1619809114.
- Fong, Y.W., C. Cattoglio, and R. Tjian. 2013. The Intertwined Roles of Transcription and Repair Proteins. *Mol. Cell.* 52:291–302. doi:10.1016/j.molcel.2013.10.018.
- Friedman, J.R., W.J. Fredericks, D.E. Jensen, D.W. Speicher, X.P. Huang, E.G. Neilson, and F.J. Rauscher III. 1996. KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev.* 10:2067–2078. doi:10.1101/gad.10.16.2067.
- Gaarenstroom, T., and C.S. Hill. 2014. TGF- β signaling to chromatin: How Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 32:107–118.

doi:10.1016/j.semcdb.2014.01.009.

- Gad, H., T. Koolmeister, A.S. Jemth, S. Eshtad, S.A. Jacques, C.E. Ström, L.M. Svensson, N. Schultz, T. Lundbäck, B.O. Einarsdottir, A. Saleh, C. Göktürk, P. Baranczewski, R. Svensson, R.P.A. Berntsson, R. Gustafsson, K. Strömberg, K. Sanjiv, M.C. Jacques-Cordonnier, M. Desroses, A.L. Gustavsson, R. Olofsson, F. Johansson, E.J. Homan, O. Loseva, L. Bräutigam, L. Johansson, A. Höglund, A. Hagenkort, T. Pham, M. Altun, F.Z. Gaugaz, S. Vikingsson, B. Evers, M. Henriksson, K.S.A. Vallin, O.A. Wallner, L.G.J. Hammarström, E. Wiita, I. Almlöf, C. Kalderén, H. Axelsson, T. Djureinovic, J.C. Puigvert, M. Häggblad, F. Jeppsson, U. Martens, C. Lundin, B. Lundgren, I. Granelli, A.J. Jensen, P. Artursson, J.A. Nilsson, P. Stenmark, M. Scobie, U.W. Berglund, and T. Helleday. 2014. MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature*. 508:215–221. doi:10.1038/nature13181.
- Gaiddon, C., N.C. Moorthy, and C. Prives. 1999. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO J*. 18:5609–5621. doi:10.1093/emboj/18.20.5609.
- Galbraith, M., M. Allen, C. Bensard, X. Wang, M. Schwinn, B. Qin, H. Long, D. Daniels, W. Hahn, R. Dowell, and J. Espinosa. 2013. HIF1A employs CDK8-Mediator to stimulate RNAPII elongation. *Cell*. 153:1327–1339. doi:10.1016/j.cell.2013.04.048.
- Garcia-Cruz, R., M.A. Brieño, I. Roig, M. Grossmann, E. Velilla, A. Pujol, L. Cabero, A. Pessarrodona, J.L. Barbero, and M. Garcia Caldés. 2010. Dynamics of cohesin proteins REC8, STAG3, SMC1 β and SMC3 are consistent with a role in sister chromatid cohesion during meiosis in human oocytes. *Hum. Reprod*. 25:2316–2327. doi:10.1093/humrep/deq180.
- Gavande, N.S., P.S. Vandervere-Carozza, H.D. Hinshaw, S.I. Jalal, C.R. Sears, K.S. Pawelczak, and J.J. Turchi. 2016. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol. Ther*. 160:65–83. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.02.003.
- Gerber, H.P., M. Hagmann, K. Seipel, O. Georgiev, M. a West, Y. Litingtung, W. Schaffner, and J.L. Corden. 1995. RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature*. 374:660–2. doi:10.1038/374660a0.
- Ghirlando, R., and G. Felsenfeld. 2016. CTCF: Making the right connections. *Genes Dev*. 30:881–891. doi:10.1101/gad.277863.116.
- Gilbert, N., S. Boyle, H. Fiegler, K. Woodfine, N.P. Carter, and W.A. Bickmore. 2004. Chromatin Architecture of the Human Genome: Gene-Rich Domains Are Enriched in Open Chromatin Fibers. *Cell*. 118:555–566. doi:10.1016/j.cell.2004.08.011.
- Girard, P.M., N. Guibourt, and S. Boiteux. 1997. The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: A 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity. *Nucleic Acids Res*. 25:3204–3211. doi:10.1093/nar/25.16.3204.
- Gligoris, T.G., J.C. Scheinost, F. Bürmann, N. Petela, K.L. Chan, P. Uluocak, F. Beckouët, S. Gruber, K. Nasmyth, and J. Löwe. 2014. Closing the cohesin ring: Structure and function of its Smc3-kleisin interface. *Science*. 346:963–967. doi:10.1126/science.1256917.
- Goldstein, M., F.A. Derheimer, J. Tait-Mulder, and M.B. Kastan. 2013. Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 110:16874–16879. doi:10.1073/pnas.1306160110.
- Goll, M.G., and T.H. Bestor. 2002. Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes Dev*. 16:1739–1742. doi:10.1101/gad.1013902.

- Goloborodko, A., M. V. Imakaev, J.F. Marko, and L. Mirny. 2016. Compaction and segregation of sister chromatids via active loop extrusion. *Elife*. 5:1–16. doi:10.7554/eLife.14864.
- Goodarzi, A.A., A.T. Noon, D. Deckbar, Y. Ziv, Y. Shiloh, M. Löbrich, and P.A. Jeggo. 2008. ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin. *Mol. Cell*. 31:167–177. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.017.
- Gorski, S.A., M. Dundr, and T. Misteli. 2006. The road much traveled: trafficking in the cell nucleus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:284–290. doi:10.1016/j.ceb.2006.03.002.
- Green, C.M., and G. Almouzni. 2002. When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* 3:28–33. doi:10.1093/embo-reports/kvf005.
- Groth, A., W. Rocha, A. Verreault, and G. Almouzni. 2007. Chromatin Challenges during DNA Replication and Repair. *Cell*. 128:721–733. doi:10.1016/j.cell.2007.01.030.
- Gruber, S. 2017. Shaping chromosomes by DNA capture and release: gating the SMC rings. *Curr. Opin. Cell Biol.* 46:87–93. doi:10.1016/j.ceb.2017.04.002.
- Gruber, S., C.H. Haering, and K. Nasmyth. 2003. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell*. 112:765–777. doi:10.1016/S0092-8674(03)00162-4.
- Guo, L., B. Giasson, A. Glavis-Bloom, M. Brewer, J. Shorter, A. Gitler, and X. Yang. 2014. A cellular system that degrades misfolded proteins and protects against neurodegeneration. *Mol. Cell*. 55:15–30.
- Haering, C.H., A.M. Farcas, P. Arumugam, J. Metson, and K. Nasmyth. 2008. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature*. 454:297–301. doi:10.1038/nature07098.
- Haering, C.H., D. Schoffnegger, T. Nishino, W. Helmhart, K. Nasmyth, and J. Löwe. 2004. Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol. Cell*. 15:951–964. doi:10.1016/j.molcel.2004.08.030.
- Haleng, J., J. Pincemail, J. Defraigne, C. Charlier, and J. Chapelle. 2007. Le stress oxydant. *Rev Med Liege*. 62:628–638. doi:10.1016/j.immbio.2006.02.001.
- Hansen, A.S., I. Pustova, C. Cattoglio, R. Tjian, and X. Darzacq. 2017. CTCF and cohesin regulate chromatin loop stability with distinct dynamics. *Elife*. 6:1–33. doi:10.7554/eLife.25776.
- Hardeland, U., M. Bentele, J. Jiricny, and P. Schär. 2003. The versatile thymine DNA-glycosylase: A comparative characterization of the human, Drosophila and fission yeast orthologs. *Nucleic Acids Res.* 31:2261–2271. doi:10.1093/nar/gkg344.
- Hauf, S., E. Roitinger, B. Koch, C.M. Dittrich, K. Mechtler, and J.M. Peters. 2005. Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* 3:0419–0432. doi:10.1371/journal.pbio.0030069.
- Hauf, S., I.C. Waizenegger, and J.M. Peters. 2001. Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science*. 293:1320–1323. doi:10.1126/science.1061376.
- Haushalter, K.A., P.T. Stukenberg, M.W. Kirschner, and G.L. Verdine. 1999. Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. *Curr. Biol.* 9:174–185. doi:10.1016/S0960-9822(99)80087-6.
- Hazra, T.K., Y.W. Kow, Z. Hatahet, B. Imhoff, I. Boldogh, S.K. Mokkalapati, S. Mitra, and T. Izumi. 2002. Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-

- derived lesions. *J. Biol. Chem.* 277:30417–30420. doi:10.1074/jbc.C200355200.
- Headlam, H.A., and M.J. Davies. 2004. Markers of protein oxidation: Different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free Radic. Biol. Med.* 36:1175–1184. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.017.
- Hegde, M.L., T.K. Hazra, and S. Mitra. 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18:27–47. doi:10.1038/cr.2008.8.
- Heidinger-Pauli, J.M., E. Ünal, V. Guacci, and D. Koshland. 2008. The Kleisin Subunit of Cohesin Dictates Damage-Induced Cohesion. *Mol. Cell.* 31:47–56. doi:10.1016/j.molcel.2008.06.005.
- Heitz, E. 1928. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Bot.* 69:762–818.
- Helleday, T., E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, and R.A. Sharma. 2008. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 8:193–204. doi:10.1038/nrc2342.
- Hengartner, C.J., V.E. Myer, S.-M. Liao, C.J. Wilson, S.S. Koh, and R.A. Young. 1998. Temporal Regulation of RNA Polymerase II by Srb10 and Kin28 Cyclin-Dependent Kinases. *Mol. Cell.* 2:43–53. doi:10.1016/S1097-2765(00)80112-4.
- Heyer, W.-D., K.T. Ehmsen, and J. Liu. 2010. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 44:113–139. doi:10.1146/annurev-genet-051710-150955.
- Hill, J.W., and M.K. Evans. 2006. Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase. *Nucleic Acids Res.* 34:1620–1632. doi:10.1093/nar/gkl060.
- Hnisz, D., B. Abraham, T. Lee, A. Lau, V. Saint-André, A. Sigova, H. Hoke, and R. Young. 2013. Transcriptional super-enhancers connected to cell identity and disease. *Cell.* 155:934–47. doi:10.1016/j.cell.2013.09.053.
- Holstege, F.C.P., E.G. Jennings, J.J. Wyrick, T.I. Lee, C.J. Hengartner, M.R. Green, T.R. Golub, E.S. Lander, and R.A. Young. 1998. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell.* 95:717–728. doi:10.1016/S0092-8674(00)81641-4.
- Horn, P.J., and C.L. Peterson. 2002. Chromatin Higher Order Folding Wrapping up Transcription. *Science.* 297:1824–1828.
- Hsin, J., and J.L. Manley. 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev.* 26:2119–2137. doi:10.1101/gad.200303.112.
- Hu, J., S.Z. Imam, K. Hashiguchi, N.C. de Souza-Pinto, and V.A. Bohr. 2005. Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase (α -OGG1) modulates its function. *Nucleic Acids Res.* 33:3271–3282. doi:10.1093/nar/gki636.
- Huang, L.E., Z. Arany, D.M. Livingston, and H. Franklin Bunn. 1996. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J. Biol. Chem.* 271:32253–32259. doi:10.1074/jbc.271.50.32253.
- Huang, S. 2000. Review: Perinucleolar structures. *J. Struct. Biol.* 129:233–240. doi:10.1006/jsbi.2000.4247.
- Huang, S., M. Hölzel, T. Knijnenburg, A. Schlicker, U. Mcdermott, M. Garnett, W. Grenrum, C. Sun, A. Prahallad, F.H. Groenendijk, L. Mitterpergher, W. Nijkamp, J. Neefjes, R. Salazar, P. Dijke, H. Uramoto, R.L. Beijersbergen, L.F.A. Wessels, and R. Bernards. 2012. MED12 Controls the Response

- to Multiple Cancer Drugs through Regulation of TGF- β Receptor Signaling. *Cell*. 151:937–950. doi:10.1016/j.cell.2012.10.035.
- Hung, R.J., J. Hall, P. Brennan, and P. Boffetta. 2005. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A huge review. *Am. J. Epidemiol.* 162:925–942. doi:10.1093/aje/kwi318.
- Ikeda, S., T. Biswas, R. Roy, T. Izumi, I. Boldogh, A. Kurosky, A.H. Sarker, S. Seki, and S. Mitra. 1998. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of Escherichia coli endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue. *J. Biol. Chem.* 273:21585–93. doi:10.1074/jbc.273.34.21585.
- Ikura, T., S. Tashiro, A. Kakino, H. Shima, N. Jacob, R. Amunugama, K. Yoder, S. Izumi, I. Kuraoka, K. Tanaka, H. Kimura, M. Ikura, S. Nishikubo, T. Ito, A. Muto, K. Miyagawa, S. Takeda, R. Fishel, K. Igarashi, and K. Kamiya. 2007. DNA Damage-Dependent Acetylation and Ubiquitination of H2AX Enhances Chromatin Dynamics. *Mol. Cell. Biol.* 27:7028–7040. doi:10.1128/MCB.00579-07.
- Imbalzano, A.N., K.S. Zaret, and R.E. Kingston. 1994. Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J. Biol. Chem.* 269:8280–8286.
- Izeddin, I., V. Récamier, L. Bosanac, I.I. Cissé, L. Boudarene, C. Dugast-Darzacq, F. Proux, O. Bénichou, R. Voituriez, O. Bensaude, M. Dahan, and X. Darzacq. 2014. Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus. *Elife*. 3:1–27. doi:10.7554/eLife.02230.
- Izumi, T., D.B. Brown, C. V. Naidu, K.K. Bhakat, M.A. MacInnes, H. Saito, D.J. Chen, and S. Mitra. 2005. Two essential but distinct functions of the mammalian abasic endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:5739–5743. doi:10.1073/pnas.0500986102.
- Izumi, T., and S. Mitra. 1998. Deletion analysis of human AP-endonuclease: Minimum sequence required for the endonuclease activity. *Carcinogenesis*. 19:525–527. doi:10.1093/carcin/19.3.525.
- Jackson, D.A. 1997. Chromatin domains and nuclear compartments: Establishing sites of gene expression in eukaryotic nuclei. *Mol. Biol. Rep.* 24:209–220. doi:10.1023/A:1006873614521.
- Jacob, K.D., N.N. Hooten, T. Tadokoro, A. Lohani, J. Barnes, and M.K. Evans. 2013. Alzheimer's disease-associated polymorphisms in human OGG1 alter catalytic activity and sensitize cells to DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 63:115–125. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.010.
- Jakob, B., J. Splinter, S. Conrad, K.O. Voss, D. Zink, M. Durante, M. Löbrich, and G. Taucher-Scholz. 2011. DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res.* 39:6489–6499. doi:10.1093/nar/gkr230.
- Jeronimo, C., M.F. Langelier, A.R. Bataille, J.M. Pascal, B.F. Pugh, and F. Robert. 2016. Tail and Kinase Modules Differently Regulate Core Mediator Recruitment and Function In Vivo. *Mol. Cell.* 64:455–466. doi:10.1016/j.molcel.2016.09.002.
- Ji, G., L. Yan, W. Liu, J. Qu, and A. Gu. 2013. OGG1 Ser326Cys polymorphism interacts with cigarette smoking to increase oxidative DNA damage in human sperm and the risk of male infertility. *Toxicol. Lett.* 218:144–149. doi:10.1016/j.toxlet.2013.01.017.
- Jiang, Y., X. Wang, S. Bao, R. Guo, D.G. Johnson, X. Shen, and L. Li. 2010. INO80 chromatin remodeling complex promotes the removal of UV lesions by the nucleotide excision repair pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:17274–17279. doi:10.1073/pnas.1008388107/-

/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1008388107.

- Kagey, M.H., J.J. Newman, S. Bilodeau, Y. Zhan, D.A. Orlando, N.L. Van Berkum, C.C. Ebmeier, J. Goossens, P.B. Rahl, S.S. Levine, D.J. Taatjes, J. Dekker, and R.A. Young. 2010. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*. 467:430–435. doi:10.1038/nature09380.
- Kahn, M. 2014. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov*. 13:513–532. doi:10.1038/nrd4233.
- Kalousi, A., and E. Soutoglou. 2016. Nuclear compartmentalization of DNA repair. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 37:148–157. doi:10.1016/j.gde.2016.05.013.
- Kang, L., W. Zhao, G. Zhang, J. Wu, and H. Guan. 2015. Acetylated 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 and its relationship with p300 and SIRT1 in lens epithelium cells from age-related cataract. *Exp. Eye Res.* 135:102–108. doi:10.1016/j.exer.2015.02.005.
- Kapoor, A., M.S. Goldberg, L.K. Cumberland, K. Ratnakumar, M.F. Segura, P.O. Emanuel, S. Menendez, C. Vardabasso, G. LeRoy, C.I. Vidal, D. Polsky, I. Osman, B.A. Garcia, E. Hernando, and E. Bernstein. 2010. The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature*. 468:1105–1111. doi:10.1038/nature09590.
- Kato, Y., R. Habas, U. Katsutama, A. Näär, and X. He. 2002. A component of the ARC/Mediator complex required for TGF β /Nodal signalling. *Nature*. 418:641–646. doi:10.1038/nature00921.1.
- Kaufmann, R., R. Straussberg, H. Mandel, A. Fattal-Valevski, B. Ben-Zeev, A. Naamati, A. Shaag, S. Zenvirt, O. Konen, A. Mimouni-Bloch, W.B. Dobyns, S. Edvardson, O. Pines, and O. Elpeleg. 2010. Infantile cerebral and cerebellar atrophy is associated with a mutation in the MED17 subunit of the transcription preinitiation mediator complex. *Am. J. Hum. Genet.* 87:667–670. doi:10.1016/j.ajhg.2010.09.016.
- Kaur, M., C. DeScipio, J. McCallum, D. Yaeger, M. Devoto, L. Jackson, N. Spinner, and I. Krantz. 2005. Precocious sister chromatid separation (PSCS) in Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet A*. 138:27–31.
- Kavli, B., O. Sundheim, M. Akbari, M. Otterlei, H. Nilsen, F. Skorpen, P.A. Aas, L. Hagen, H.E. Krokan, and G. Slupphaug. 2002. hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup. *J. Biol. Chem.* 277:39926–39936. doi:10.1074/jbc.M207107200.
- van der Kemp, P.A., J.B. Charbonnier, M. Audebert, and S. Boiteux. 2004. Catalytic and DNA-binding properties of the human Ogg1 DNA N-glycosylase/AP lyase: Biochemical exploration of H270, Q315 and F319, three amino acids of the 8-oxoguanine-binding pocket. *Nucleic Acids Res.* 32:570–578. doi:10.1093/nar/gkh224.
- van der Kemp, P., D. Thomas, R. Barbey, R. de Oliveira, and S. Boiteux. 1996. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:5197–5202. doi:10.1073/pnas.93.11.5197.
- Khansari, N., Y. Shakiba, and M. Mahmoudi. 2009. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 3:73–80. doi:10.2174/187221309787158371.

- Khobta, A., and B. Epe. 2012. Interactions between DNA damage, repair, and transcription. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 736:5–14. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.07.014.
- Khobta, A., N. Kitsera, B. Speckmann, and B. Epe. 2009. 8-Oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) causes a transcriptional inactivation of damaged DNA in the absence of functional Cockayne syndrome B (Csb) protein. *DNA Repair (Amst).* 8:309–317. doi:10.1016/j.dnarep.2008.11.006.
- Kikuchi, Y., H. Umemura, S. Nishitani, S. Iida, R. Fukasawa, H. Hayashi, Y. Hirose, A. Tanaka, K. Sugasawa, and Y. Ohkuma. 2015. Human mediator MED17 subunit plays essential roles in gene regulation by associating with the transcription and DNA repair machineries. *Genes to Cells.* 20:191–202. doi:10.1111/gtc.12210.
- Kim, D.I., and K.J. Roux. 2016. Filling the Void: Proximity-Based Labeling of Proteins in Living Cells. *Trends Cell Biol.* 26:804–817. doi:10.1016/j.tcb.2016.09.004.
- Kim, J.S., T.B. Krasieva, V. LaMorte, A. Malcolm, R. Taylor, and K. Yokomori. 2002a. Specific recruitment of human cohesin to laser-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* 277:45149–45153. doi:10.1074/jbc.M209123200.
- Kim, S., X. Xu, A. Hecht, and T.G. Boyer. 2006. Mediator is a transducer of Wnt/ β -catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 281:14066–14075. doi:10.1074/jbc.M602696200.
- Kim, S.T., B. Xu, and M.B. Kastan. 2002b. Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev.* 16:560–570. doi:10.1101/gad.970602.
- Kitagawa, R., C.J. Bakkenist, P.J. McKinnon, and M.B. Kastan. 2004. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev.* 18:1423–1438. doi:10.1101/gad.1200304.
- Kitsera, N., D. Stathis, B. Lühnsdorf, H. Müller, T. Carell, B. Epe, and A. Khobta. 2011. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1. *Nucleic Acids Res.* 39:5926–5934. doi:10.1093/nar/gkr163.
- Klungland, a, I. Rosewell, S. Hollenbach, E. Larsen, G. Daly, B. Epe, E. Seeberg, T. Lindahl, and D.E. Barnes. 1999. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:13300–5. doi:10.1073/pnas.96.23.13300.
- Knuesel, M.T., K.D. Meyer, C. Bernecky, and D.J. Taatjes. 2009a. The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function. *Genes Dev.* 23:439–451. doi:10.1101/gad.1767009.
- Knuesel, M.T., K.D. Meyer, A.J. Donner, J.M. Espinosa, and D.J. Taatjes. 2009b. The Human CDK8 Subcomplex Is a Histone Kinase That Requires Med12 for Activity and Can Function Independently of Mediator. *Mol. Cell. Biol.* 29:650–661. doi:10.1128/MCB.00993-08.
- Kohno, T., H. Kunitoh, K. Toyama, S. Yamamoto, A. Kuchiba, D. Saito, N. Yanagitani, S.I. Ishihara, R. Saito, and J. Yokota. 2006. Association of the OGG1-Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk. *Cancer Sci.* 97:724–728. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00240.x.
- Kon, A., L.Y. Shih, M. Minamino, M. Sanada, Y. Shiraishi, Y. Nagata, K. Yoshida, Y. Okuno, M. Bando, R. Nakato, S. Ishikawa, A. Sato-Otsubo, G. Nagae, A. Nishimoto, C. Haferlach, D. Nowak, Y. Sato, T. Alpermann, M. Nagasaki, T. Shimamura, H. Tanaka, K. Chiba, R. Yamamoto, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, T. Nakamaki, K. Ishiyama, F. Nolte, W.K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Chiba, H. Mori, H. Nakauchi, H.P. Koeffler, H. Aburatani, T. Haferlach, K. Shirahige, S. Miyano, and S. Ogawa. 2013. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex

- in myeloid neoplasms. *Nat. Genet.* 45:1232–1237. doi:10.1038/ng.2731.
- Kornberg, R. 1974. Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science.* 184:868–871.
- Kovtun, I. V., Y. Liu, M. Bjoras, A. Klungland, S.H. Wilson, and C.T. McMurray. 2007. OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature.* 447:447–452. doi:10.1038/nature05778.
- Krokan, H., H. Nilsen, F. Skorpen, M. Otterlei, and G. Slupphaug. 2000. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett.* 476:73–77. doi:10.1016/S0014-5793(00)01674-4.
- Kruhlak, M.J., A. Celeste, G. Dellaire, O. Fernandez-Capetillo, W.G. Müller, J.G. McNally, D.P. Bazett-Jones, and A. Nussenzweig. 2006. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 172:823–834. doi:10.1083/jcb.200510015.
- Kschonsak, M., and C.H. Haering. 2015. Shaping mitotic chromosomes: From classical concepts to molecular mechanisms. *BioEssays.* 37:755–766. doi:10.1002/bies.201500020.
- Kuznetsov, N.A., V. V. Koval, D.O. Zharkov, G.A. Nevinsky, K.T. Douglas, and O.S. Fedorova. 2005. Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.* 33:3919–3931. doi:10.1093/nar/gki694.
- Labahn, J., O.D. Schärer, A. Long, K. Ezaz-Nikpay, G.L. Verdine, and T.E. Ellenberger. 1996. Structural basis for the excision repair of alkylation-damaged DNA. *Cell.* 86:321–329. doi:10.1016/S0092-8674(00)80103-8.
- Lachner, M., D. O’Carroll, S. Rea, K. Mechtler, and T. Jenuwein. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 410:116–20. doi:10.1038/35065132.
- Ladurner, R., E. Kreidl, M.P. Ivanov, H. Ekker, M.H. Idarraga-Amado, G.A. Busslinger, G. Wutz, D.A. Cisneros, and J. Peters. 2016. Sororin actively maintains sister chromatid cohesion. *EMBO J.* 35:635–653. doi:10.15252/embj.201592532.
- Lafarga, M., M. Berciano, E. Pena, I. Mayo, J. Castano, D. Bohmann, J. Rodrigues, J. Tavanetz, and M. Carmo-Fonseca. 2002. Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol. Biol. Cell.* 13:2771–82.
- Lai, F., U. Orom, M. Cesaroni, M. Beringer, D. Taatjes, G. Blobel, and R. Shiekhattar. 2013. Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature.* 494:497–501. doi:10.1038/nature11884.
- Lamond, A.I., and J.E. Sleeman. 2003. Nuclear substructure and dynamics. *Curr. Biol.* 13:R825–R828. doi:10.1016/j.cub.2003.10.012.
- Lan, L., S. Nakajima, L. Wei, L. Sun, C.L. Hsieh, R.W. Sobol, M. Bruchez, B. Van Houten, A. Yasui, and A.S. Levine. 2014. Novel method for site-specific induction of oxidative DNA damage reveals differences in recruitment of repair proteins to heterochromatin and euchromatin. *Nucleic Acids Res.* 42:2330–2345. doi:10.1093/nar/gkt1233.
- Larsen, E., K. Kwon, F. Coin, J.M. Egly, and A. Klungland. 2004. Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA. *DNA Repair (Amst).* 3:1457–1468. doi:10.1016/j.dnarep.2004.06.008.
- Lee, T., and R. Young. 2000. Transcription of Eukaryotic Protein- Coding Genes. *Annu. Rev. Genet.* 34:77–137.

- Lee, T., and R. Young. 2013. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*. 152:1237–1251. doi:10.1016/j.cell.2013.02.014.
- Lehmann, A.R. 2011. DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells. *DNA Repair (Amst)*. 10:730–733. doi:10.1016/j.dnarep.2011.04.023.
- Lehmann, A.R., M. Walicka, D.J. Griffiths, J.M. Murray, F.Z. Watts, S. McCready, and A.M. Carr. 1995. The rad18 gene of *Schizosaccharomyces pombe* defines a new subgroup of the SMC superfamily involved in DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* 15:7067–7080. doi:10.1128/MCB.15.12.7067.
- Liguori, I., G. Russo, F. Curcio, G. Bulli, L. Aran, D. Della-morte, G. Testa, F. Cacciatore, D. Bonaduce, and P. Abete. 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 13:757–772.
- Lindahl, T. 1974. An N-Glycosidase from *Escherichia coli* That Releases Free Uracil from DNA Containing Deaminated Cytosine Residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71:3649–3653. doi:10.1073/pnas.71.9.3649.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 362:709–15.
- Litt, M., M. Simpson, M. Gaszner, C. Allis, and G. Felsenfeld. 2001. Correlation Between Histone Lysine Methylation and Developmental Changes at the Chicken beta-Globin Locus. *Science*. 293:2453–2455. doi:10.1126/science.1064413.
- Liu, H., S. Rankin, and H. Yu. 2013. Phosphorylation-enabled binding of SGO1-PP2A to cohesin protects sororin and centromeric cohesin during mitosis. *Nat. Cell Biol.* 15:40–49. doi:10.1038/ncb2637.
- Llères, D., S. Swift, and A.I. Lamond. 2007. Detecting Protein-Protein Interactions In Vivo with FRET using Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). *Curr. Protoc. Cytom.* 12:1–19. doi:10.1002/0471142956.cy1210s42.
- van Loon, B., and U. Hübscher. 2009. An 8-oxo-guanine repair pathway coordinated by MUTYH glycosylase and DNA polymerase lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:18201–18206. doi:10.1073/pnas.0907280106.
- Losada, A. 2014. Cohesin in cancer: Chromosome segregation and beyond. *Nat. Rev. Cancer*. 14:389–393. doi:10.1038/nrc3743.
- Losada, A., and T. Hirano. 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: The first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* 19:1269–1287. doi:10.1101/gad.1320505.
- Losada, A., T. Yokochi, R. Kobayashi, and T. Hirano. 2000. Identification and characterization of SA/Scp3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *J. Cell Biol.* 150:405–416. doi:10.1083/jcb.150.3.405.
- De Los Santos, C., C.-W. Chang, M.-A. Mycek, and R.A. Cardullo. 2015. FRAP, FLIM, and FRET: Detection and analysis of cellular dynamics on a molecular scale using fluorescence microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* 82:587–604. doi:10.1002/mrd.22501.
- Luger, K., A.W. Mäder, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 389:251–260. doi:10.1038/38444.
- Luijsterburg, M.S., M. Lindh, K. Acs, M.G. Vrouwe, A. Pines, H. van Attikum, L.H. Mullenders, and N.P. Dantuma. 2012. DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J. Cell*

- Biol.* 197:267–281. doi:10.1083/jcb.201106074.
- Luna, L., V. Rolseth, G.A. Hildrestrand, M. Otterlei, F. Dantzer, M. Bjørås, and E. Seeberg. 2005. Dynamic relocalization of hOGG1 during the cell cycle is disrupted in cells harbouring the hOGG1-Cys326 polymorphic variant. *Nucleic Acids Res.* 33:1813–1824. doi:10.1093/nar/gki325.
- Luo, H., Y. Li, J.J. Mu, J. Zhang, T. Tonaka, Y. Hamamori, Y.J. Sung, Y. Wang, and J. Qin. 2008. Regulation of intra-S phase checkpoint by ionizing radiation (IR)-dependent and IR-independent phosphorylation of SMC3. *J. Biol. Chem.* 283:19176–19183. doi:10.1074/jbc.M802299200.
- Luo, Z., C. Lin, E. Guest, A. Garrett, N. Mohaghegh, S. Swanson, S. Marshall, L. Florens, M. Washburn, and A. Shilatifard. 2012. The Super Elongation Complex Family of RNA Polymerase II Elongation Factors: Gene Target Specificity and Transcriptional Output. *Mol. Cell. Biol.* 32:2608–2617. doi:10.1128/MCB.00182-12.
- Luscombe, N.M., S.E. Austin, H.M. Berman†, and J.M. Thornton. 2000. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol.* 1:1–1. doi:10.1186/gb-2000-1-1-reviews001.
- Maga, G., G. Villani, E. Crespan, U. Wimmer, E. Ferrari, B. Bertocci, and U. Hübscher. 2007. 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature.* 447:606–608. doi:10.1038/nature05843.
- Mäkinen, N., M. Mehine, J. Tolvanen, E. Kaasinen, Y. Li, H. Lehtonen, M. Gentile, J. Yan, M. Enge, M. Taipale, M. Aavikko, R. Katainen, E. Virolainen, T. Böhling, T. Koski, V. Launonen, J. Sjöberg, J. Taipale, P. Vahteristo, and L. Aaltonen. 2011. MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science.* 334:252–5.
- Malik, S., and R. Roeder. 2010. The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* 11:761–772. doi:10.1038/nrg2901.
- Malik, S., and R.G. Roeder. 2000. Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem. Sci.* 25:277–283. doi:10.1016/S0968-0004(00)01596-6.
- Mao, G., X. Pan, B.-B. Zhu, Y. Zhang, F. Yuan, J. Huang, M.A. Lovell, M.P. Lee, W.R. Markesbery, G.-M. Li, and L. Gu. 2007. Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer’s disease. *Nucleic Acids Res.* 35:2759–2766. doi:10.1093/nar/gkm189.
- Marino-Ramirez, L., M. Kann, B. Shoemaker, and D. Landsman. 2005. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics.* 2:719–29.
- Marintchev, A., M.R. Gryk, and G.P. Mullen. 2003. Site-directed mutagenesis analysis of the structural interaction of the single-strand-break repair protein, X-ray cross-complementing group 1, with DNA polymerase β . *Nucleic Acids Res.* 31:580–588. doi:10.1093/nar/gkg159.
- Markkanen, E. 2017. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 59:82–105. doi:10.1016/j.dnarep.2017.09.007.
- Markkanen, E., J. Dorn, and U. Hübscher. 2013. MUTYH DNA glycosylase: The rationale for removing undamaged bases from the DNA. *Front. Genet.* 4:1–20. doi:10.3389/fgene.2013.00018.
- Marsin, S., A.E. Vidal, M. Sossou, J. Ménessier-De Murcia, F. Le Page, S. Boiteux, G. De Murcia, and J.P. Radicella. 2003. Role of XRCC1 in the Coordination and Stimulation of Oxidative DNA Damage Repair Initiated by the DNA Glycosylase hOGG1. *J. Biol. Chem.* 278:44068–44074. doi:10.1074/jbc.M306160200.

- Masson, M., C. Niedergang, V. Schreiber, S. Muller, J. Menissier-de Murcia, and G. de Murcia. 1998. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 18:3563–71. doi:0270-7306/98.
- McCullough, A., M. Dodson, and R. Lloyd. 1999. Initiation of base excision repair: Glycosylase mechanisms and structures. *Annu. Rev. Biochem.* 68:255–285.
- Meas, R., J.J. Wyrick, and M.J. Smerdon. 2017. Nucleosomes regulate base excision repair in chromatin. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 10:1–8. doi:10.1016/j.mrrev.2017.10.002.
- Meira, L.B., S. Devaraj, G.E. Kisby, D.K. Burns, R.L. Daniel, R.E. Hammer, S. Grundy, I. Jialal, and E.C. Friedberg. 2001. Heterozygosity for the Mouse Apex Gene Results in Phenotypes Associated with Oxidative Stress. *Cancer Res.* 61:5552–5557.
- Menoni, H., D. Gasparutto, A. Hamiche, J. Cadet, S. Dimitrov, P. Bouvet, and D. Angelov. 2007. ATP-Dependent Chromatin Remodeling Is Required for Base Excision Repair in Conventional but Not in Variant H2A.Bbd Nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* 27:5949–5956. doi:10.1128/MCB.00376-07.
- Menoni, H., J.H.J. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 2012a. Nucleotide excision repair-initiating proteins bind to oxidative DNA lesions in vivo. *J. Cell Biol.* 199:1037–1046. doi:10.1083/jcb.201205149.
- Menoni, H., M.S. Shukla, V. Gerson, S. Dimitrov, and D. Angelov. 2012b. Base excision repair of 8-oxoG in dinucleosomes. *Nucleic Acids Res.* 40:692–700. doi:10.1093/nar/gkr761.
- Meyer, K.D., A.J. Donner, M.T. Knuesel, A.G. York, J.M. Espinosa, and D.J. Taatjes. 2008. Cooperative activity of cdk8 and GCN5L within Mediator directs tandem phosphoacetylation of histone H3. *EMBO J.* 27:1447–1457. doi:10.1038/emboj.2008.78.
- Michaels, M.L.E.O., and J.H. Miller. 1992. The GO System Protects Organisms from the Mutagenic Effect of the Spontaneous Lesion 8-Hydroxyguanine (7,8-Dihydro-8-Oxoguanine). *J. Bacteriol.* 174:6321–6325.
- Miller, C., I. Matic, K.C. Maier, B. Schwalb, S. Roether, K. Strässer, A. Tresch, M. Mann, and P. Cramer. 2012. Mediator phosphorylation prevents stress response transcription during non-stress conditions. *J. Biol. Chem.* 287:44017–44026. doi:10.1074/jbc.M112.430140.
- Minowa, O., T. Arai, M. Hirano, Y. Monden, S. Nakai, M. Fukuda, M. Itoh, H. Takano, Y. Hippou, H. Aburatani, K. Masumura, T. Nohmi, S. Nishimura, and T. Noda. 2000. Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:4156–4161. doi:10.1073/pnas.050404497.
- Misteli, T. 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J. Cell Sci.* 113:1841–1849. doi:10.1126/science.1209417.
- Misteli, T., J. Cáceres, and D. Spector. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature.* 387:523–7. doi:10.1038/387523a0.
- Mizzen, C.A., X.J. Yang, T. Kokubo, J.E. Brownell, A.J. Bannister, T. Owen-Hughes, J. Workman, L. Wang, S.L. Berger, T. Kouzarides, Y. Nakatani, and C.D. Allis. 1996. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell.* 87:1261–1270. doi:10.1016/S0092-8674(00)81821-8.
- Mjelle, R., S.A. Hegre, P.A. Aas, G. Slupphaug, F. Drabløs, P. Sætrum, and H.E. Krokan. 2015. Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. *DNA Repair (Amst).* 30:53–

67. doi:10.1016/j.dnarep.2015.03.007.
- Morales, C., and A. Losada. 2018. Establishing and dissolving cohesion during the vertebrate cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52:51–57. doi:10.1016/j.ceb.2018.01.010.
- Moritz, E., K. Pauly, A. Bravard, J. Hall, J. Pablo Radicella, and B. Epe. 2014. hOGG1-Cys326 variant cells are hypersensitive to DNA repair inhibition by nitric oxide. *Carcinogenesis.* 35:1426–1433. doi:10.1093/carcin/bgu066.
- Morland, I., V. Rolseth, L. Luna, T. Rognes, M. Bjørås, and E. Seeberg. 2002. Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA. *Nucleic Acids Res.* 30:4926–36. doi:10.1093/nar/gkf618.
- Morris, E., J. Ji, F. Yang, L. Stefano, A. Herr, N. Moon, E. Kwon, K. Haigis, A. Näär, and N. Dyson. 2008. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature.* 455:552–556. doi:10.1038/nature07310.
- Muftuoglu, M., N.C. de Souza-Pinto, A. Dogan, M. Aamann, T. Stevnsner, I. Rybanska, G. Kirkali, M. Dizdaroglu, and V.A. Bohr. 2009. Cockayne syndrome group B protein stimulates repair of formamidopyrimidines by NEIL1 DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* 284:9270–9279. doi:10.1074/jbc.M807006200.
- Mukhopadhyay, A., J.M. Kramer, G. Merckx, D. Lugtenberg, D.F. Smeets, M.A.W. Oortveld, E.A.W. Blokland, J. Agrawal, A. Schenck, H. Van Bokhoven, E. Huys, E.F. Schoenmakers, A.G. Van Kessel, C.E. Van Nouhuys, and F.P.M. Cremers. 2010. CDK19 is disrupted in a female patient with bilateral congenital retinal folds, microcephaly and mild mental retardation. *Hum. Genet.* 128:281–291. doi:10.1007/s00439-010-0848-x.
- Muncke, N., C. Jung, H. Rüdiger, H. Ulmer, R. Roeth, A. Hubert, E. Goldmuntz, D. Driscoll, J. Goodship, K. Schön, and G. Rappold. 2003. Missense Mutations and Gene Interruption in PROSIT240, a Novel TRAP240-Like Gene, in Patients with Congenital Heart Defect (Transposition of the Great Arteries). *Circulation.* 108:2843–2850. doi:10.1161/01.CIR.0000103684.77636.CD.
- Murayama, Y., and F. Uhlmann. 2014. Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature.* 505:367–371. doi:10.1038/nature12867.
- Näär, A.M., D.J. Taatjes, W. Zhai, E. Nogales, and R. Tjian. 2002. Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes Dev.* 16:1339–1344. doi:10.1101/gad.987602.
- Nakamura, J., and J. a Swenberg. 1999. Endogenous Apurinic/Apyrimidinic Sites in Genomic DNA of Mammalian Tissues. *Cancer Res.* 59:2522–2526.
- Nash, R.A., K.W. Caldecott, D.E. Barnes, and T. Lindahl. 1997. XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry.* 36:5207–5211. doi:10.1021/bi962281m.
- Nasmyth, K. 2011. Cohesin: A catenase with separate entry and exit gates? *Nat. Cell Biol.* 13:1170–1177. doi:10.1038/ncb2349.
- Nasmyth, K., and C.H. Haering. 2005. The Structure and Function of Smc and Kleisin Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 74:595–648. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219.
- Nasmyth, K., and C.H. Haering. 2009. Cohesin: Its Roles and Mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* 43:525–558. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134233.

- Nazarkina, Z.K., S.N. Khodyreva, S. Marsin, O.I. Lavrik, and J.P. Radicella. 2007. XRCC1 interactions with base excision repair DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)*. 6:254–264. doi:10.1016/j.dnarep.2006.10.002.
- Németh, A., and I. Grummt. 2018. Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52:105–111. doi:10.1016/j.ceb.2018.02.013.
- Niki, H., R. Imamura, M. Kitaoka, K. Yamanaka, T. Ogura, and S. Hiraga. 1992. E.coli MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. *EMBO J.* 11:5101–9.
- Niki, H., A. Jaffe, R. Imamura, T. Ogura, and S. Hiraga. 1991. The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of E.coli. *EMBO J.* 10:183–193.
- Nishi, T., N. Shimizu, M. Hiramoto, I. Sato, Y. Yamaguchi, M. Hasegawa, S. Aizama, H. Tanaka, K. Kataoka, H. Watanabe, and H. Handa. 2002. Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B in vivo. *J Biol Chem.* 277:44548–56.
- Nishiyama, T., R. Ladurner, J. Schmitz, E. Kreidl, A. Schleiffer, V. Bhaskara, M. Bando, K. Shirahige, A.A. Hyman, K. Mechtler, and J.M. Peters. 2010. Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell.* 143:737–749. doi:10.1016/j.cell.2010.10.031.
- Nishiyama, T., M. Sykora, P. Huis in't Veld, K. Mechtler, and J. Peters. 2013. Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:13404–9.
- Nitzsche, A., M. Paszkowski-Rogacz, F. Matarese, E.M. Janssen-Megens, N.C. Hubner, H. Schulz, I. de Vries, L. Ding, N. Huebner, M. Mann, H.G. Stunnenberg, and F. Buchholz. 2011. RAD21 cooperates with pluripotency transcription factors in the maintenance of embryonic stem cell identity. *PLoS One.* 6:a19470. doi:10.1371/journal.pone.0019470.
- Noren Hooten, N., K. Kompaniez, J. Barnes, A. Lohani, and M.K. Evans. 2011. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *J. Biol. Chem.* 286:44679–44690. doi:10.1074/jbc.M111.255869.
- Notarnicola, S., M. McIntosh, and K. Wise. 1991. A Mycoplasma hyorhinitis protein with sequence similarities to nucleotide-binding enzymes. *Gene.* 97:77–85.
- Novotný, I., A. Malinová, E. Stejskalová, D. Matějů, K. Klimešová, A. Roithová, M. Švéda, Z. Knejzlík, and D. Staněk. 2015. SART3-Dependent Accumulation of Incomplete Spliceosomal snRNPs in Cajal Bodies. *Cell Rep.* 10:429–440. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.030.
- Nunes, V.S., and N.S. Moretti. 2017. Nuclear subcompartments: an overview. *Cell Biol. Int.* 41:2–7. doi:10.1002/cbin.10703.
- Ordway, J.M., D. Eberhart, and T. Curran. 2003. Cysteine 64 of Ref-1 is not essential for redox regulation of AP-1 DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 23:4257–66. doi:10.1128/MCB.23.12.4257.
- Ørom, U.A., T. Derrien, M. Beringer, K. Gumireddy, A. Gardini, G. Bussotti, F. Lai, M. Zytnicki, C. Notredame, Q. Huang, R. Guigo, and R. Shiekhattar. 2010. Long non-coding RNAs with enhancer-like function in human. *Cell.* 143:46–58. doi:10.1016/j.cell.2010.09.001.
- Palipoch, S., and P. Koomhin. 2015. Oxidative stress-associated pathology: A review. *Sains*

- Malaysiana*. 44:1441–1451. doi:10.17576/jsm-2015-4410-09.
- Pan, L., B. Zhu, W. Hao, X. Zeng, S.A. Vlahopoulos, T.K. Hazra, M.L. Hegde, Z. Radak, A. Bacsi, A.R. Brasier, X. Ba, and I. Boldogh. 2016. Oxidized guanine base lesions function in 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated epigenetic regulation of nuclear factor κ B-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* 291:25553–25566. doi:10.1074/jbc.M116.751453.
- Pandey, M., and S. Raghavan. 2017. DNA Double-strand Break Repair in Mammals. *J Radiat Cancer Res.* 8:93–7. doi:10.4103/jrcr.jrcr.
- Parelho, V., S. Hadjur, M. Spivakov, M. Leleu, S. Sauer, H.C. Gregson, A. Jarmuz, C. Canzonetta, Z. Webster, T. Nesterova, B.S. Cobb, K. Yokomori, N. Dillon, L. Aragon, A.G. Fisher, and M. Merkenschlager. 2008. Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell.* 132:422–433. doi:10.1016/j.cell.2008.01.011.
- Pelish, H., B. Liao, I. Nitulescu, A. Tangpeerachaikul, Z. Poss, D. Da Silva, B. Caruso, A. Arefolov, O. Fadeyi, A. Christie, K. Du, D. Banka, E. Schneider, A. Jestel, G. Zou, C. Si, C. Ebmeier, R. Bronson, A. Krivtsov, A. Myers, N. Kohl, A. Kung, S. Armstrong, M. Lemieux, D. Taatjes, and M. Shair. 2015. Mediator Kinase Inhibition Further Activates Super-Enhancer Associated Genes in AML. *Nature.* 526:273–276. doi:10.1038/nature14904.
- Pepperkok, R., A. Squire, S. Geley, and P.I.H.H. Bastiaens. 1999. Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr. Biol.* 9:269–274. doi:10.1016/S0960-9822(99)80117-1.
- Pisoschi, A.M., and A. Pop. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97:55–74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
- Plaschka, C., L. Larivière, L. Wenzek, M. Seizl, M. Hemann, D. Tegunov, E. V. Petrotchenko, C.H. Borchers, W. Baumeister, F. Herzog, E. Villa, and P. Cramer. 2015. Architecture of the RNA polymerase II-Mediator core initiation complex. *Nature.* 518:376–380. doi:10.1038/nature14229.
- Polo, S.E., and G. Almouzni. 2015. Chromatin dynamics after DNA damage: the legacy of the Access-Repair-Restore model. *DNA Repair (Amst).* 36:114–121.
- Polo, S.E., D. Roche, and G. Almouzni. 2006. New Histone Incorporation Marks Sites of UV Repair in Human Cells. *Cell.* 127:481–493. doi:10.1016/j.cell.2006.08.049.
- Pommier, Y., C. Redon, V.A. Rao, J.A. Seiler, O. Sordet, H. Takemura, S. Antony, L.H. Meng, Z.Y. Liao, G. Kohlhaagen, H.L. Zhang, and K.W. Kohn. 2003. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 532:173–203. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.08.016.
- Poss, Z., C. Ebmeier, A. Odell, A. Tangpeerachaikul, T. Lee, H. Pelish, M. Shair, R. Dowell, W. Old, and D. Taatjes. 2016. Identification of Mediator kinase substrates in human cells using cortistatin A and quantitative phosphoproteomics. *Cell.* 15:436–450. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.006.SRSF2.
- Poss, Z.C., C.C. Ebmeier, and D.J. Taatjes. 2013. The Mediator complex and transcription regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48:575–608. doi:10.3109/10409238.2013.840259.
- Poulsen, H.E., E. Specht, K. Broedbaek, T. Henriksen, C. Ellervik, T. Mandrup-Poulsen, M. Tonnesen, P.E. Nielsen, H.U. Andersen, and A. Weimann. 2012. RNA modifications by oxidation: A novel disease mechanism? *Free Radic. Biol. Med.* 52:1353–1361. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.009.
- Prakash, A., S. Doublie, and S. Wallace. 2012. The Fpg/Nei family of DNA glycosylases: substrates,

- structures and search for damage. *Prg Mol Biol Transl.* 110:71–91. doi:10.1016/B978-0-12-387665-2.00004-3.
- Pulice, J.L., and C. Kadoch. 2016. Composition and Function of Mammalian SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes in Human Disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 81:53–60. doi:10.1101/sqb.2016.81.031021.
- Radicella, J.P., C. Dherin, C. Desmaze, M.S. Fox, and S. Boiteux. 1997. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:8010–8015. doi:10.1073/pnas.94.15.8010.
- Rahl, P.B., C.Y. Lin, A.C. Seila, R.A. Flynn, S. McCuine, C.B. Burge, P.A. Sharp, and R.A. Young. 2010. C-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell.* 141:432–445. doi:10.1016/j.cell.2010.03.030.
- Ramsden, D.B., P.W.L. Ho, J.W.M. Ho, H.F. Liu, D.H.F. So, H.M. Tse, K.H. Chan, and S.L. Ho. 2012. Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): Structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain Behav.* 2:468–478. doi:10.1002/brb3.55.
- Rao, S., M. Huntley, N. Durand, E. Stamenova, I. Bochkov, J. Robinson, A. Sanborn, I. Machol, A. Omer, E. Lander, and E. Aiden. 2014. A three-dimensional map of the genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell.* 159:1665–80.
- Rao, V.K., A. Pal, and R. Taneja. 2017. A drive in SUVs: From development to disease. *Epigenetics.* 12:177–186. doi:10.1080/15592294.2017.1281502.
- Reardon, J.T., T. Bessho, H.C. Kung, P.H. Bolton, and A. Sancar. 1997. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:9463–9468. doi:10.1073/pnas.94.17.9463.
- Revenkova, E., M. Eijpe, C. Heyting, C.A. Hodges, P.A. Hunt, B. Liebe, H. Scherthan, and R. Jessberger. 2004. Cohesin SMC1 β is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat. Cell Biol.* 6:555–562. doi:10.1038/ncb1135.
- Revenkova, E., K. Hermann, C. Adelfalk, and R. Jessberger. 2010. Ovocyte cohesin expression restricted to predictyate stages provides full fertility and prevents aneuploidy. *Curr Biol.* 20:1529–33.
- Risheg, H., J.M. Graham, R.D. Clark, R.C. Rogers, J.M. Opitz, J.B. Moeschler, A.P. Peiffer, M. May, S.M. Joseph, J.R. Jones, R.E. Stevenson, C.E. Schwartz, and M.J. Friez. 2007. A recurrent mutation in MED12 leading to R961W causes Opitz-Kaveggia syndrome. *Nat. Genet.* 39:451–453. doi:10.1038/ng1992.
- Ritchie, K., C. Seah, J. Moulin, C. Isaac, F. Dick, and N.G. Bérubé. 2008. Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects. *J. Cell Biol.* 180:315–324. doi:10.1083/jcb.200706083.
- Robinson, P.J., M.J. Trnka, R. Pellarin, C.H. Greenberg, D.A. Bushnell, R. Davis, A.L. Burlingame, A. Sali, and R.D. Kornberg. 2015. Molecular architecture of the yeast Mediator complex. *Elife.* 4:1–29. doi:10.7554/eLife.08719.
- Rocha, P.P., W. Bleiss, and H. Schrewe. 2010. Mosaic expression of Med12 in female mice leads to exencephaly, spina bifida, and craniorachischisis. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* 88:626–632. doi:10.1002/bdra.20693.

- Ropa, J., N. Saha, Z. Chen, J. Serio, W. Chen, D. Mellacheruvu, L. Zhao, V. Basrur, A.I. Nesvizhskii, and A.G. Muntean. 2018. PAF1 complex interactions with SETDB1 mediate promoter H3K9 methylation and transcriptional repression of *Hoxa9* and *Meis1* in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 9:22123–22136. doi:10.18632/oncotarget.25204.
- Rudd, S.G., N.C.K. Valerie, and T. Helleday. 2016. Pathways controlling dNTP pools to maintain genome stability. *DNA Repair (Amst)*. 44:193–204. doi:10.1016/j.dnarep.2016.05.032.
- Russo, M.T., G. De Luca, P. Degan, E. Parlanti, E. Dogliotti, D.E. Barnes, T. Lindahl, H. Yang, J.H. Miller, and M. Bignami. 2004. Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the *Myh* and *Ogg1* DNA glycosylases. *Cancer Res*. 64:4411–4414. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0355.
- Sahin, U., O. Ferhi, M. Jeanne, S. Benhenda, C. Berthier, F. Jollivet, M. Niwa-Kawakita, O. Faklaris, N. Setterblad, H. de Thé, and V. Lallemand-Breitenbach. 2014. Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *J. Cell Biol*. 204:931–945. doi:10.1083/jcb.201305148.
- Sainsbury, S., C. Bernecky, and P. Cramer. 2015. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 16:129–143. doi:10.1038/nrm3952.
- Sakamoto, K., Y. Tominaga, K. Yamauchi, Y. Nakatsu, K. Sakumi, K. Yoshiyama, A. Egashira, S. Kura, T. Yao, M. Tsuneyoshi, H. Maki, Y. Nakabeppu, and T. Tsuzuki. 2007. MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 67:6599–6604. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4802.
- Sakumi, K., Y. Tominaga, M. Furuichi, P. Xu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu. 2003. *Ogg1* Knockout-associated Lung Tumorigenesis and Its Suppression by *Mth1* Gene Disruption. *Cancer Res*. 63:902–905.
- Sanyal, A., B. Lajoie, G. Jain, and J. Dekker. 2012. The long-range interaction landscape of gene promoters. *Nature*. 489:109–113. doi:10.1038/nature11279.
- Satou, K., K. Kawai, H. Kasai, H. Harashima, and H. Kamiya. 2007. Mutagenic effects of 8-hydroxy-dGTP in live mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med*. 42:1552–1560. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.024.
- Sattler, U., P. Frit, B. Salles, and P. Calsou. 2003. Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells. *EMBO Rep*. 4:363–367. doi:10.1038/sj.embor.embor796.
- Schärer, O.D. 2013. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5:a012609. doi:10.1101/cshperspect.a012609.
- Schmidt, D., P.C. Schwalie, C.S. Ross-Innes, A. Hurtado, G.D. Brown, J.S. Carroll, P. Flicek, and D.T. Odom. 2010. A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome Res*. 20:578–588. doi:10.1101/gr.100479.109.
- Schmitz, J., E. Watrin, P. Lénárt, K. Mechtler, and J.M. Peters. 2007. Sororin Is Required for Stable Binding of Cohesin to Chromatin and for Sister Chromatid Cohesion in Interphase. *Curr. Biol*. 17:630–636. doi:10.1016/j.cub.2007.02.029.
- Schüle, B., A. Oviedo, K. Johnston, S. Pai, and U. Francke. 2005. Inactivating mutations in *ESCO2* cause SC phocomelia and Roberts syndrome: no phenotype-genotype correlation. *Am. J. Hum. Genet*. 77:1117–28. doi:10.1086/498695.

- Schultz, D.C., K. Ayyanathan, D. Negorev, G.G. Maul, and F.J. Rauscher III. 2002. SETDB1 : a novel KAP-1 - associated histone H3 , lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* 16:919–932. doi:10.1101/gad.973302.
- Schultz, D.C., J.R. Friedman, and F.J. Rauscher. 2001. Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: The PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 α subunit of NuRD. *Genes Dev.* 15:428–443. doi:10.1101/gad.869501.
- Seet, R.C.S., C.Y.J. Lee, E.C.H. Lim, J.J.H. Tan, A.M.L. Quek, W.L. Chong, W.F. Looi, S.H. Huang, H. Wang, Y.H. Chan, and B. Halliwell. 2010. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radic. Biol. Med.* 48:560–566. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.026.
- Seitan, V., B. Hao, K. Tachibana-Konwalski, T. Lavagnoli, H. Mira-Bontenbal, K. Brown, G. Teng, T. Carroll, A. Terry, K. Horan, H. Marks, D. Adams, D. Schatz, L. Aaragon, A. Fisher, M. Krangel, K. Nasmyth, and M. Merckenschlager. 2011. A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature.* 476:467–71.
- Shibutani, S., M. Takeshita, and A. Grollman. 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature.* 349:431–4. doi:10.1038/353737a0.
- Shimura, K., T. Kohno, H. Kasai, K. Koda, H. Sugimura, and J. Yokota. 1998. Infrequent mutations of the hOGG1 gene, that is involved in the excision of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, in human gastric cancer. *Japanese J. Cancer Res.* 89:825–828. doi:10.1111/j.1349-7006.1998.tb00635.x.
- Sies, H., C. Berndt, and D. Jones. 2017. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86:715–48.
- Sjögren, C., and K. Nasmyth. 2001. Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* 11:991–995. doi:10.1016/S0960-9822(01)00271-8.
- Sliwinska, A., P. Sitarek, M. Toma, P. Czarny, E. Synowiec, R. Krupa, P. Wigner, K. Bialek, D. Kwiatkowski, A. Korycinska, I. Majsterek, J. Szemraj, P. Galecki, and T. Sliwinski. 2017. Decreased expression level of BER genes in Alzheimer's disease patients is not derivative of their DNA methylation status. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 79:311–316. doi:10.1016/j.pnpbp.2017.07.010.
- Smerdon, M.J. 1991. DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:422–8. doi:10.1016/0955-0674(91)90069-B.
- Smerdon, M.J., and M.W. Lieberman. 1978. Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA- repair synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:4238–41. doi:10.1073/pnas.75.9.4238.
- Solomon, D., J. Kim, J. Bondaruk, S. Shariat, Z. Wang, A. Elkahlon, T. Ozawa, J. Gerard, D. Zhuang, S. Zhang, N. Navai, A. Siefker-radtke, J. Phillips, B. Robinson, M. Rubin, B. Volkmer, R. Hautmann, R. Küfer, P. Hogendoorn, G. Netto, D. Theodorescu, C. James, B. Czerniak, M. Miettinen, and T. Waldman. 2013. Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer. *Nat Genet.* 45:1428–30. doi:10.1038/ng.2800.
- Sonoda, E., T. Matsusaka, C. Morrison, P. Vagnarelli, O. Hoshi, T. Ushiki, K. Nojima, T. Fukagawa, I.C. Waizenegger, J.M. Peters, W.C. Earnshaw, and S. Takeda. 2001. Scc1/Rad21/Mcd1 Is Required

- for Sister Chromatid Cohesion and Kinetochores Function in Vertebrate Cells. *Dev. Cell.* 1:759–770. doi:10.1016/S1534-5807(01)00088-0.
- Soria, G., S.E. Polo, and G. Almouzni. 2012. Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response. *Mol. Cell.* 46:722–734. doi:10.1016/j.molcel.2012.06.002.
- Sossou, M., C. Flohr-Beckhaus, I. Schulz, F. Daboussi, B. Epe, and J.P. Radicella. 2005. APE1 overexpression in XRCC1-deficient cells complements the defective repair of oxidative single strand breaks but increases genomic instability. *Nucleic Acids Res.* 33:298–306. doi:10.1093/nar/gki173.
- Soutourina, J. 2018. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19:262–274. doi:10.1038/nrm.2017.115.
- Spaeth, J.M., N.H. Kim, and T.G. Boyer. 2011. Mediator and human disease. *Semin Cell Dev Biol.* 22:776–787. doi:10.1002/ar.20849.3D.
- Spector, D.L. 2001. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* 114:2891–3.
- Spector, D.L. 2003. The Dynamics of Chromosome Organization and Gene Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 72:573–608. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161724.
- Spivak, G. 2015. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair (Amst).* 36:13–18. doi:10.1016/j.dnarep.2015.09.003.
- Sripathy, S.P., J. Stevens, and D.C. Schultz. 2006. The KAP1 Corepressor Functions To Coordinate the Assembly of De Novo HP1-Demarcated Microenvironments of Heterochromatin Required for KRAB Zinc Finger Protein-Mediated Transcriptional Repression. *Mol. Cell. Biol.* 26:8623–8638. doi:10.1128/MCB.00487-06.
- Staněk, D., and A. Fox. 2017. Nuclear bodies: new insights into structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 46:94–101. doi:10.1016/j.ceb.2017.05.001.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403:41–45. doi:10.1038/47412.
- Ström, L., H.B. Lindroos, K. Shirahige, and C. Sjögren. 2004. Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Mol. Cell.* 16:1003–1015. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.026.
- Strunnikov, A., V. Larionov, and D. Koshland. 1993. SMCI: An Essential Yeast Gene Encoding a Putative Head-Rod-Tail Protein Is Required for Nuclear Division and Defines a New Ubiquitous Protein Family. *J. Cell Biol.* 123:1635–1648. doi:10.1083/jcb.123.6.1635.
- Stults, D.M., M.W. Killen, H.H. Pierce, and A.J. Pierce. 2008. Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome Res.* 18:13–18. doi:10.1101/gr.6858507.
- Sung, C.-C., Y.-C. Hsu, C.-C. Chen, Y.-F. Lin, and C.-C. Wu. 2013. Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013:1–15. doi:10.1155/2013/301982.
- Svejstrup, J.Q., Y. Li, J. Fellows, A. Gnatt, S. Bjorklund, and R.D. Kornberg. 1997. Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:6075–8. doi:10.1073/pnas.94.12.6075.
- Taatjes, D.J. 2010. The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription.

- Trends Biochem. Sci.* 35:315–322. doi:10.1016/j.tibs.2010.02.004.
- Taatjes, D.J., A.M. Na, E. Nogales, and R. Tjian. 2002. Structure, Function, and Conformations of the CRSP Coactivator. *Science*. 295:1058–1062. doi:10.1126/science.1065249.
- Tahara, Y., D. Auld, D. Ji, A. Beharry, A. Kietrys, D. Wilson, M. Jimenez, D. King, Z. Nguyen, and E. Kool. 2018. Potent and selective inhibitors of 8-oxoguanine DNA glycosylase. *J Am Chem Soc.* 140:2105–2114. doi:10.1021/jacs.7b09316.
- Takahashi, H., T. Parmely, S. Sato, C. Tomoromi-Sato, C. Banks, S. Kong, H. Szutorisz, S. Swanson, S. Brown, M. Washburn, L. Florens, C. Seidel, C. Lin, E. Smith, A. Shilatifard, R. Conaway, and J. Conaway. 2011. Human Mediator subunit MED26 functions as a docking site for transcription elongation factors. *Cell*. 146:92–104. doi:10.1016/j.cell.2011.06.005.
- Tanaka, T., J. Fuchs, J. Loidl, and K. Nasmyth. 2000. Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. *Nat. Cell Biol.* 2:492–499. doi:10.1038/35019529.
- Thompson, C.M., A.J. Koleske, D.M. Chao, and R.A. Young. 1993. A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell*. 73:1361–1375. doi:10.1016/0092-8674(93)90362.
- Thurman, R.E., E. Rynes, R. Humbert, J. Vierstra, M.T. Maurano, E. Haugen, N.C. Sheffield, A.B. Stergachis, H. Wang, B. Vernot, K. Garg, S. John, R. Sandstrom, D. Bates, L. Boatman, T.K. Canfield, M. Diegel, D. Dunn, A.K. Ebersol, T. Frum, E. Giste, A.K. Johnson, E.M. Johnson, T. Kutuyavin, B. Lajoie, B.K. Lee, K. Lee, D. London, D. Lotakis, S. Neph, F. Neri, E.D. Nguyen, H. Qu, A.P. Reynolds, V. Roach, A. Safi, M.E. Sanchez, A. Sanyal, A. Shafer, J.M. Simon, L. Song, S. Vong, M. Weaver, Y. Yan, Z. Zhang, Z. Zhang, B. Lenhard, M. Tewari, M.O. Dorschner, R.S. Hansen, P.A. Navas, G. Stamatoyannopoulos, V.R. Iyer, J.D. Lieb, S.R. Sunyaev, J.M. Akey, P.J. Sabo, R. Kaul, T.S. Furey, J. Dekker, G.E. Crawford, and J.A. Stamatoyannopoulos. 2012. The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature*. 489:75–82. doi:10.1038/nature11232.
- Tropberger, P., S. Pott, C. Keller, K. Kamieniarz-Gdula, M. Caron, F. Richter, G. Li, G. Mittler, E.T. Liu, M. Bühler, R. Margueron, and R. Schneider. 2013. Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer. *Cell*. 152:859–872. doi:10.1016/j.cell.2013.01.032.
- Tsai, K., S. Shigeo, C. Tomoromi-Sato, R. Conaway, J. Conaway, and F. Asturias. 2013. A conserved Mediator-CDK8 kinase module association regulates Mediator-RNA polymerase II interaction. *Nat Struct Mol Biol.* 20:611–619. doi:10.1038/nsmb.2549.
- Tsai, K., C. Tomoromi-Sato, S. Sato, C. RC, C. JW, and F. Asturias. 2014. Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional Mediator complex. *Cell*. 157:1430–1444. doi:10.1016/j.cell.2014.05.015.
- Tuo, J., C. Chen, X. Zeng, M. Christiansen, and V.A. Bohr. 2002. Functional crosstalk between hOgg1 and the helicase domain of Cockayne syndrome group B protein. *DNA Repair (Amst)*. 1:913–927. doi:10.1016/S1568-7864(02)00116-7.
- Uhlmann, F. 2016. SMC complexes: From DNA to chromosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17:399–412. doi:10.1038/nrm.2016.30.
- Uhlmann, F., and K. Nasmyth. 1998. Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr. Biol.* 8:1095–1102. doi:10.1016/S0960-9822(98)70463-4.

- Ünal, E., A. Arbel-Eden, U. Sattler, R. Shroff, M. Lichten, J.E. Haber, and D. Koshland. 2004. DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol. Cell.* 16:991–1002. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.027.
- Uttara, B., A. V Singh, P. Zamboni, and R.T. Mahajan. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 7:65–74. doi:10.2174/157015909787602823.
- Valle-García, D., Z.A. Qadeer, D.S. McHugh, F.G. Ghiraldini, A.H. Chowdhury, D. Hasson, M.A. Dyer, F. Recillas-Targa, and E. Bernstein. 2016. ATRX binds to atypical chromatin domains at the 3' exons of zinc finger genes to preserve H3K9me3 enrichment. *Epigenetics.* 11:398–414. doi:10.1080/15592294.2016.1169351.
- Vannini, A., and P. Cramer. 2012. Conservation between the RNA Polymerase I, II, and III Transcription Initiation Machineries. *Mol. Cell.* 45:439–446. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.023.
- Vaquerizas, J.M., S.K. Kummerfeld, S.A. Teichmann, and N.M. Luscombe. 2009. A census of human transcription factors: Function, expression and evolution. *Nat. Rev. Genet.* 10:252–263. doi:10.1038/nrg2538.
- Vega, H., A.H. Trainer, M. Gordillo, M. Crosier, H. Kayserili, F. Skovby, M.L.G. Uzielli, R.E. Schnur, S. Manouvrier, E. Blair, J.A. Hurst, F. Forzano, M. Meins, K.O.J. Simola, A. Raas-Rothschild, R.C.M. Hennekam, and E.W. Jabs. 2010. Phenotypic variability in 49 cases of ESCO2 mutations, including novel missense and codon deletion in the acetyltransferase domain, correlates with ESCO2 expression and establishes the clinical criteria for Roberts syndrome. *J. Med. Genet.* 47:30–37. doi:10.1136/jmg.2009.068395.
- Vidal, A., I. Hickson, S. Boiteux, and J. Radiclla. 2001a. Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res.* 29:1285–1292. doi:10.1093/nar/29.6.1285.
- Vidal, A.E., S. Boiteux, I.D. Hickson, and J.P. Radicella. 2001b. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J.* 20:6530–6539. doi:10.1093/emboj/20.22.6530.
- Vijayvargia, R., M.S. May, and J.D. Fondell. 2007. A coregulatory role for the mediator complex in prostate cancer cell proliferation and gene expression. *Cancer Res.* 67:4034–4041. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3039.
- Vrouwe, M.G., E. Elghalbzouri-Maghrani, M. Meijers, P. Schouten, B.C. Godthelp, Z.A. Bhuiyan, E.J. Redeker, M.M. Mannens, L.H.F. Mullenders, A. Pastink, and F. Darroudi. 2007. Increased DNA damage sensitivity of Cornelia de Lange syndrome cells: Evidence for impaired recombinational repair. *Hum. Mol. Genet.* 16:1478–1487. doi:10.1093/hmg/ddm098.
- Wallace, S.S., D.L. Murphy, and J.B. Sweasy. 2012. Base excision repair and cancer. *Cancer Lett.* 327:73–89. doi:10.1016/j.canlet.2011.12.038.
- Wang, X.Q.D., and J. Dostie. 2017. Chromosome folding and its regulation in health and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 43:23–30. doi:10.1016/j.gde.2016.10.006.
- Watrin, E., F.J. Kaiser, and K.S. Wendt. 2016. Gene regulation and chromatin organization: Relevance of cohesin mutations to human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 37:59–66. doi:10.1016/j.gde.2015.12.004.
- Weiss, J.M., E.L. Goode, W.C. Ladiges, and C.M. Ulrich. 2005. Polymorphic variation in hOGG1 and

- risk of cancer: A review of the functional and epidemiologic literature. *Mol. Carcinog.* 42:127–141. doi:10.1002/mc.20067.
- Wendt, K.S., K. Yoshida, T. Itoh, M. Bando, B. Koch, E. Schirghuber, S. Tsutsumi, G. Nagae, K. Ishihara, T. Mishiro, K. Yahata, F. Imamoto, H. Aburatani, M. Nakao, N. Imamoto, K. Maeshima, K. Shirahige, and J.M. Peters. 2008. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature.* 451:796–801. doi:10.1038/nature06634.
- West, A.G., M. Gaszner, and G. Felsenfeld. 2002. Insulators : many functions , many mechanisms Insulators : many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16:271–288. doi:10.1101/gad.954702.
- Will, O., E. Gocke, I. Eckert, I. Schulz, M. Pflaum, H.C. Mahler, and B. Epe. 1999. Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022. *Mutat. Res. - DNA Repair.* 435:89–101. doi:10.1016/S0921-8777(99)00039-7.
- Witztum, J.L., and D. Steinberg. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 88:1785–1792. doi:10.1172/JCI115499.
- Wong, H.K., M. Muftuoglu, G. Beck, S.Z. Imam, V.A. Bohr, and D.M. Wilson III. 2007. Cockayne syndrome B protein stimulates apurinic endonuclease 1 activity and protects against agents that introduce base excision repair intermediates. *Nucleic Acids Res.* 35:4103–4113. doi:10.1093/nar/gkm404.
- Xanthoudakis, S., G. Miao, F. Wang, Y.C. Pan, and T. Curran. 1992. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* 11:3323–35.
- Xie, Y., H. Yang, C. Cunanan, K. Okamoto, D. Shibata, J. Pan, D.E. Barnes, T. Lindahl, M. McIlhatton, R. Fishel, and J.H. Miller. 2004. Deficiencies in Mouse *Myh* and *Ogg1* Result in Tumor Predisposition and G to T Mutations in Codon 12 of the *K-Ras* Oncogene in Lung Tumors. *Cancer Res.* 64:3096–3102. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3834.
- Xu, F., K. Zhang, and M. Grunstein. 2005. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell.* 121:375–385. doi:10.1016/j.cell.2005.03.011.
- Yan, M., H. Xu, N. Waddell, K. Shield-Artin, I. Haviv, M.J. McKay, and S.B. Fox. 2012. Enhanced RAD21 cohesin expression confers poor prognosis in BRCA2 and BRCA1, but not BRCA1 familial breast cancers. *Breast Cancer Res.* 14:R69. doi:10.1186/bcr3176.
- Yang, C., E. Bolotin, T. Jiang, F. Sladek, and E. Martinez. 2007. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene.* 389:52–65. doi:10.1080/10810730902873927.
- Yazdi, P.T., Y. Wang, S. Zhao, N. Patel, E.Y.H.P. Lee, and J. Qin. 2002. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev.* 16:571–582. doi:10.1101/gad.970702.
- Yeung, P., N. Denissova, C. Nasello, Z. Hakhverdyan, J. Chen, and M. Brenneman. 2012. Promyelocytic leukemia nuclear bodies support a late step in DNA double-strand break repair by homologous recombination. *J. Biol. Chem.* 113:1787–99.
- Yoshihara, M., L. Jiang, S. Akatsuka, M. Suyama, and S. Toyokuni. 2014. Genome-wide profiling of 8-oxoguanine reveals its association with spatial positioning in nucleus. *DNA Res.* 21:603–612. doi:10.1093/dnares/dsu023.
- Zhang, B., S. Jain, H. Song, M. Fu, R.O. Heuckeroth, J.M. Erlich, P.Y. Jay, and J. Milbrandt. 2007.

- Mice lacking sister chromatid cohesion protein PDS5B exhibit developmental abnormalities reminiscent of Cornelia de Lange syndrome. *Development*. 134:3191–3201. doi:10.1242/dev.005884.
- Zhou, H., J.M. Spaeth, N.H. Kim, X. Xu, M.J. Friez, C.E. Schwartz, and T.G. Boyer. 2012. MED12 mutations link intellectual disability syndromes with dysregulated GLI3-dependent Sonic Hedgehog signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:19763–19768. doi:10.1073/pnas.1121120109.
- Zhou, J., M. Liu, A.M. Fleming, C.J. Burrows, and S.S. Wallace. 2013. Neil3 and NEIL1 DNA glycosylases remove oxidative damages from quadruplex DNA and exhibit preferences for lesions in the telomeric sequence context. *J. Biol. Chem.* 288:27263–27272. doi:10.1074/jbc.M113.479055.
- Zhou, X., W. Wang, C. Du, F. Yan, S. Yang, K. He, H. Wang, and A. Zhao. 2018. OGG1 regulates the level of symmetric dimethylation of histone H4 arginine-3 by interacting with PRMT5. *Mol. Cell. Probes*. 38:19–24. doi:10.1016/j.mcp.2018.01.002.
- Ziv, Y., D. Bielopolski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D.C. Schultz, J. Lukas, S. Bekker-Jensen, J. Bartek, and Y. Shiloh. 2006. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM-and KAP-1 dependent pathway. *Nat. Cell Biol.* 8:870–876. doi:10.1038/ncb1446.
- Zolan, M., C. Smith, C. NM, and H. PC. 1982. Rearrangement of mammalian chromatin structure following excision repair. *Nature*. 299:462–4.
- Zou, G.-M., and A. Maitra. 2008. Small-molecule inhibitor of the AP endonuclease 1/REF-1 E3330 inhibits pancreatic cancer cell growth and migration. *Mol. Cancer Ther.* 7:2012–2021. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0113.
- Zuin, J., J.R. Dixon, M.I.J.A. van der Reijden, Z. Ye, P. Kolovos, R.W.W. Brouwer, M.P.C. van de Corput, H.J.G. van de Werken, T.A. Knoch, W.F.J. van IJcken, F.G. Grosveld, B. Ren, and K.S. Wendt. 2014. Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:996–1001. doi:10.1073/pnas.1317788111.

Titre : Rôle du médiateur et des cohésines dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN

Mots clés : Réparation de l'ADN, OGG1, chromatine, stress oxydatif, médiateur, cohésines

Résumé : Les composants cellulaires sont constamment exposés à un stress oxydatif, lié à l'environnement et au métabolisme cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène produites par ce stress induisent de nombreuses lésions dans l'ADN, telles que l'oxydation des bases, la formation de sites abasiques ou la cassure de brins d'ADN. Ces dommages sont corrigés par un panel de systèmes de réparation, qui jouent un rôle critique dans la survie cellulaire et dans la prévention de pathologies telles que les maladies neurodégénératives ou le cancer. La modification de bases est le type de dommage le plus abondant, généré spontanément ou par des agents exogènes. Notre laboratoire s'intéresse ainsi au système de réparation par excision de base (BER), qui élimine les bases nucléotidiques altérées. Des études antérieures ont montré la formation « d'usines de réparation du BER » suite à des traitements induisant l'oxydation des bases dont la forme la plus courante est la 8-oxoguanine (8-oxoG). Dans le cas de cette lésion mutagène, l'assemblage du complexe BER dépend du recrutement d'OGG1 à la chromatine, l'enzyme qui reconnaît et excise la 8-oxoG. Cependant, ce recrutement ne nécessite pas la reconnaissance de la 8-oxoG, indiquant que d'autres signaux interviennent pour initier la réparation de la 8-oxoG par OGG1. Un crible à haut débit a été réalisé dans des cellules humaines pour rechercher des protéines impliquées dans le recrutement d'OGG1. Deux complexes ont été identifiés, les cohésines et le médiateur de la transcription. Dans ce projet de recherche, nous avons exploré le rôle de ces protéines dans la relocalisation d'OGG1 suite à un stress oxydatif. Nos études ont tout d'abord permis d'identifier des protéines essentielles au recrutement d'OGG1 : les protéines formant l'anneau de cohésines (SMC1, SMC3 et RAD21), plusieurs sous-unités du médiateur dont MED14, ainsi que le module CDK (MED12, MED13, Cycline C et CDK8). De plus, ces protéines sont nécessaires pour le recrutement d'OGG1 tout au long du cycle cellulaire. Nos résultats montrent que la relocalisation d'OGG1 sur la chromatine est liée à sa fonction de réparation de la 8-oxoG. Nous avons d'autre part montré que deux sous-unités du médiateur (MED12 et CDK8) sont relocalisées dans l'euchromatine, comme OGG1, de façon dépendante du corps du médiateur et des cohésines. Enfin, l'association d'OGG1 avec ses partenaires a été validée par microscopie FLIM-FRET et co-immunoprécipitation dans des conditions de stress oxydatif. En conclusion, ces résultats montrent pour la première fois un lien entre la réparation des bases oxydées et les complexes du médiateur et des cohésines, tous deux connus pour leur participation à d'autres voies de réparation de l'ADN. L'identification des mécanismes moléculaires et de nouveaux facteurs impliqués dans la réparation des bases oxydées pourrait fournir à terme des éléments essentiels pour la prise en charge de maladies telles que le cancer ou les maladies neurodégénératives.

Title : Mediator's and Cohesin's role in the repair of oxidative DNA damage

Keywords : DNA repair, OGG1, chromatin, oxidative stress, mediator, cohesins

Abstract : Our laboratory focuses on the base excision repair (BER) mechanism that is responsible for the removal of damaged bases in DNA. Oxidative DNA damage is generated spontaneously by the endogenous metabolism of the cells or induced exogenously by chemical or physical agents. Our aim is to understand how BER complexes are assembled in the context of the cell nucleus in response to genotoxic stress. We previously found that after treatments generating oxidized bases into cellular DNA BER complexes are assembled on the chromatin. In the case of the 8-oxoguanine (8-oxoG) mutagenic lesion, assembly of the BER complex depends on the recruitment to the chromatin of OGG1, the DNA glycosylase that recognizes and excises the lesion. Surprisingly, characterization of OGG1 mutants that are not able to recognize 8-oxoG showed that the recruitment of this initiator protein does not require the recognition of the damaged base. This suggests that there are other mechanisms that allow recruitment of the enzyme to chromatin and thus initiation of the repair of the 8-oxoG by the BER. We performed a high-throughput siRNA screen in human cells to identify proteins required for the recruitment of OGG1 to chromatin. Among the candidates issued from the screen, two groups of proteins were selected for further study: members of the mediator and cohesin complexes. In this project, we explored the role of these proteins in OGG1 relocalization after an oxidative stress. Our studies confirmed the requirement of essential proteins for OGG1 recruitment: cohesins subunits (SMC1, SMC3 and RAD21), mediator subunits including the central protein MED14, and CDK subunits (MED12, MED13, Cyclin C and CDK8). Requirement of all these proteins is independent of the cell cycle. Furthermore we show that recruitment of OGG1 is essential for its 8-oxoG repair function. Microscopy studies revealed recruitment and colocalization of two mediator subunits (MED12 and CDK8) with OGG1 on euchromatin domains after an oxidative stress. Finally, the association between OGG1 and its partners, specifically after an oxidative stress, was validated by FLIM-FRET microscopy and co-immunoprecipitation. To conclude, these results show for the first time a link between repair of oxidized bases and mediator and cohesin complexes, both of them being already involved in other DNA repair pathways. The identification of molecular mechanisms and new factors involved in the repair of oxidized bases may ultimately provide new elements for the management of diseases such as cancer and neurodegenerative diseases.

