



HAL
open science

Le facteur de réparation XPC est un cofacteur de l'ARN polymérase II régulant les modifications post-traductionnelles des histones lors de la transcription

Maryssa Semer

► To cite this version:

Maryssa Semer. Le facteur de réparation XPC est un cofacteur de l'ARN polymérase II régulant les modifications post-traductionnelles des histones lors de la transcription. *Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]*. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ040 . tel-02119090

HAL Id: tel-02119090

<https://theses.hal.science/tel-02119090>

Submitted on 3 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.

ÉCOLE DOCTORALE des sciences de la vie et de la santé de Strasbourg

IGBMC- CNRS 7104 – INSERM U 964

THÈSE présentée par :

Maryssa SEMER

soutenue le : 29 Juin 2018

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Le facteur de réparation XPC est un cofacteur de
l'ARN polymérase II régulant les modifications post-
traductionnelles des histones lors de la transcription**

THÈSE dirigée par :

Dr COIN Frédéric

Dr, IGBMC, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr SOUTOURINA Julie

Dr, CEA

Dr JACOB Yves

Dr, Institut Pasteur

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr DEVYS Didier

Dr, IGBMC, Université de Strasbourg

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr. Frédéric Coin pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son laboratoire. Merci au Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie de m'avoir accordé une bourse pendant 3 ans, et au Dr. Jean-Marc Egly d'avoir financé mes 6 derniers mois.

Merci Madame Julie Soutourina, Messieurs Yves Jacob et Didier Devys d'avoir accepté d'être membre de mon jury.

Un immense merci au Dr Nicolas Le May, sans qui je n'aurais pas pu finir cette thèse et sans qui tout ça n'existerait pas. Tu as pris mon projet sous ton aile et lui a permis d'aller beaucoup plus loin que l'on pensait. Tu y a toujours cru et heureusement ! Cette thèse est un peu ton bébé.

Merci à toute les plateformes de l'IGBMC. Un clin d'œil spécial à Anthony du service Informatique.

Un énorme merci et d'énormes pensées aux membres de l'équipe : Federico, Jérémy, Annabel, Zita Carlos, Cathy, Philipe, Manu, Li-Chiao, Pietro et Baptiste. J'ai passé de très bon moment avec vous malgré des périodes assez compliquées au sein de l'équipe.

Merci Zita de m'avoir prise sous ton aile et ça depuis le stage de Master II. Tu es une femme formidable et inspirante.

Une énorme pensée à Annabel et Cathy, merci pour votre aide et pour tout ce que vous avez pu m'apprendre.

A mon Fédé... J'ai adoré partager le box avec Nicolas et toi. On a formé une super équipe, assez bruyante certes, mais tellement fun. Je t'adore (et Spoon aussi).

Merci à Jérémy et Sébastien pour ces folles nuits en boite de nuit, votre soutien, votre amitié (mais surtout pour Netflix !). J'ai trouvé deux formidables amis en vous, pour de bonnes soirées et parties de rigolade et avec qui je peux totalement rester moi-même. Merci Elise pour les remises en questions et les batailles féministes. Tu es un sacré bout de femme qui m'a aidée à m'assumer. Merci aux Thomas.

Merci à la Team du Get Together ! On a quand même bien rigolé... ! Merci Véronique pour la découverte du Kendo.

Merci à ma Zoé et à Yann. Toujours loin à voyager et pourtant si proches.

Enfin merci à mes parents pour tout. Vous m'avez permis de partir très loin de la maison pour continuer mes études. J'ai grandi et découvert la vraie vie, loin de vous. Mais vous avez toujours été proches (merci la technologie). Après 4 ans séparés, nous nous retrouvons enfin pour fêter la fin (normalement) de mes études. Vous m'avez tellement manqués (Boulette aussi, je suis pas une mère indigne Maman). Merci à mes frères et ma sœur.

Merci JC, j'ai pu vivre de formidables aventures grâce à ta passion pour la moto. Je suis tellement fière de toi.

Merci JS, Isabelle et les filles pour ces beaux Noël, avec beaucoup trop de nourriture, ces beaux anniversaires.

Merci Sam et ta petite tribu. On ne se voit (vraiment) pas souvent et pourtant c'est comme si c'était le cas.

Mon amour, j'ai vraiment cru que je n'arriverais jamais à la fin de cet enfer et tu as toujours été là à me secouer pour me pousser jusqu'au bout. Je n'ai pas été la meilleure Maryssa pendant ces presque 4 ans, et tu es quand même resté. J'espère que ce nouveau chapitre de ma vie va me permettre de te montrer la vraie personne que je suis au fond et nous permettre d'aller encore plus loin, tous les deux vers de nouvelles aventures. Merci à mes deux boules de poils, que j'aime par-dessus tout.

Merci à tous les tarés de Immanis Crossfit ! Vous rencontrer et partager ces WOD de folie a été une des meilleures choses de ces 3 ans et demi. J'ai partagé tellement de beaux moments avec vous : Steeve, Les Caro's, Valérie et Cédric, Doudou, Lauryane et Elise, Cécile et PA, Rivière Blanche, Charlotte et tous les autres... Merci Pierre, Merci Anna, Merci Lionel

Résumé	5
Index des figures	11
Index des tableaux	12
Abréviations.....	13
Introduction	16
I) La réparation de l'ADN : la voie NER.....	18
A) Les différentes voies de réparation de l'ADN	18
B) Les dommages reconnus par la NER.....	18
C) Les deux sous-voies de la NER.....	19
a) La GG-NER.....	20
b) La TC-NER.....	24
II) La transcription des gènes de classe II : modèle des gènes régulés par le récepteur à l'acide rétinolique.	25
A) Généralités	26
a) L'ARN polymérase II.....	26
b) Les facteurs généraux de transcription.....	29
c) Le promoteur et les séquences régulatrices de l'ADN	32
a) La transcription.....	35
B) La régulation de l'environnement chromatinien	38
a) L'organisation de la chromatine	38
b) Les variants d'histones.....	40
c) Les modifications post-traductionnelles.....	43
d) La méthylation de l'ADN	51
C) La transcription des gènes régulés par le récepteur à l'acide rétinolique (RAR)	53
a) Les récepteurs nucléaires	53
b) Le récepteur à l'acide rétinolique.....	54
c) La transcription des gènes ciblés par le récepteur à l'Acide rétinolique	55
III) Les maladies liées à un défaut de la NER	56
A) Xeroderma Pigmentosum (XP)	57
B) Le syndrome de Cockayne (CS)	60
C) La Trichothiodystrophie (TTD)	61
IV) Les facteurs NER: Nouveaux facteurs de transcription	62
V) Problématique	65
Résultats	66
Publication 1	68
Publication 2	69
Publication 3	70
Discussion	71
Annexes	77
Références.....	79

Résumé

Le facteur de réparation XPC est un cofacteur de l'ARN polymérase II régulant les modifications post-traductionnelles des histones lors de la transcription

Introduction :

La transcription des gènes pour des protéines par l'ARN polymérase II est un processus hautement régulé qui nécessite le recrutement de nombreux complexes dont des facteurs de transcription spécifiques comme les récepteurs nucléaires (NRs), des co-activateurs et le Médiateur. Cette phase précède et permet la formation du complexe de pré- initiation (PIC), incluant les facteurs généraux de transcription, l'ARN polymérase II, combinée à un important remodelage de la chromatine permettant la synthèse de l'ARNm. Cependant, de nombreux agents génotoxiques tels que les irradiations UV sont responsables de modifications au niveau de la structure de l'ADN perturbant le bon fonctionnement des processus nucléaires dont la transcription. Pour maintenir l'intégrité du génome, les lésions engendrées sur l'ADN peuvent être éliminées via de nombreux mécanismes de réparation et notamment la réparation par excision de nucléotides (NER) divisée en 2 sous-voies (Lindahl and Wood, 1999): la réparation globale du génome (GG-NER) qui élimine les dommages sur l'ADN localisés sur l'ensemble du génome et la réparation couplée à la transcription (TC-NER) qui corrige les lésions situées sur le brin activement transcrit de l'ADN risquant de bloquer l'ARN pol II (Fousteri and Mullenders, 2008; Hanawalt and Spivak, 2008). Ces voies NER impliquent une cascade de complexes protéiques dont des senseurs des dommages sur l'ADN (XPC/HR23B, CSB), TFIIH qui ouvre l'ADN via les hélicases XPB et XPD, des facteurs stabilisant XPA ou RPA. Finalement, les endonucléases XPG et XPF-ERCC1 sont recrutées et incisent un patch d'ADN contenant la lésion avant l'étape de resynthèse.

Des mutations dans 11 gènes (*TTD-A*, *XPA-G*, *XPV*, *CSA* and *CSB*), parmi les 30 impliqués dans la NER, ont été associées à des maladies génétiques humaines dont le *xeroderma pigmentosum* (XP), la Trichothiodystrophie (TTD) et le syndrome de Cockayne (CS). Les patients souffrant de ces pathologies présentent une large variété de symptômes (Lehmann, 2003). XP est caractérisé par une sensibilité au soleil et un risque accru aux cancers cutanés. Approximativement, 30% des individus affectés développent en plus des symptômes neurologiques. TTD est caractérisée par des cheveux cassants déficients en soufre, un vieillissement prématuré, une ichthyose ainsi que des problèmes neurologiques. Les patients CS sont sensibles à la lumière du soleil sans prédisposition aux cancers cutanés, ont une petite stature et présentent un vieillissement prématuré. Les symptômes observés chez les

patients affectés par ces différentes maladies génétiques sont issus d'une combinaison de défauts au niveau de la réparation de l'ADN ainsi que de la transcription reflétant la dualité fonctionnelle des facteurs NER (Compe and Egly, 2012).

Nous avons montré au sein du laboratoire que des mutations de la sous-unité XPD de TFIIH (Compe et al., 2005, 2007; Keriél et al., 2002) ainsi que des mutations de XPC, XPA, XPG, XPF et CSB (Ito et al., 2007; Le May et al., 2010a, 2012a; Proietti-De-Santis et al., 2006) entraînent une dérégulation de la transactivation des gènes ciblés par les récepteurs nucléaires (NRs). D'un point de vue mécanistique, TFIIH est fortement impliqué dans l'initiation de la transcription (Compe and Egly, 2012) en ouvrant le promoteur (Coin et al., 1999), phosphorylant l'ARN pol II (Lu et al., 1992) ainsi que de nombreux facteurs de transcription dont les NRs. L'ensemble de ces actions induit finalement l'échappement du promoteur de la machinerie transcriptionnelle permettant la transition vers l'élongation. Plus récemment, des travaux issus du laboratoire ont montré que les facteurs NER XPC, CSB, XPA, RPA, XPG and ERCC1-XPF sont également recrutés avec la machinerie transcriptionnelle en absence d'attaques génotoxiques (Le May et al., 2010). Leur présence sur la région promotrice est précédée par la formation du PIC et est séquentielle selon l'ordre suivant : XPC/CSB, XPA/RPA et XPG/ERCC1-XPF. Ces facteurs NER influencent le remodelage de la chromatine associé à la transcription active participant à la déméthylation active de l'ADN ainsi qu'aux modifications post-traductionnelles (PTMs) des histones nécessaires à la mise en place d'une conformation accessible de la chromatine (Le May et al., 2010a; Schmitz et al., 2009). Des fibroblastes primaires dérivés de patients XP (décrits précédemment comme déficients en réparation) présentent également une dérégulation transcriptionnelle due à l'absence de la formation de chromatine décondensée et accessible au niveau du promoteur. Ainsi ces études ont participé à la redéfinition de l'étiologie des maladies génétiques XP, TTD et CS.

Le but de ma thèse a été de mieux comprendre les fonctions des facteurs NER au niveau de la régulation de l'expression des gènes. Mon travail durant ces trois dernières années s'est focalisé sur le facteur XPC en déterminant son rôle transcriptionnel à l'échelle génomique afin de mieux comprendre les conséquences de sa dérégulation dans un contexte pathologique. En ce sens, mon second objectif a été de caractériser au niveau moléculaire l'étiologie de nouveaux patients XP en analysant de manière combinée les évènements moléculaires de la NER et la transcription associés à XPC.

Résultats :

Une corrélation est désormais clairement établie entre une transcription défectueuse dans certaines cellules de patients XP et les fonctions des facteurs NER dans le remodelage de la chromatine. A la lumière de ces connaissances et sur l'étiologie de XP, XPC semble jouer les premiers rôles aussi bien en réparation de l'ADN qu'en transcription. Le groupe de complémentation XP-C (représentant environ 46 mutations différentes tout le long du gène *XPC*) représente 25 à 40% de tous les patients XP en particulier dans les pays d'Europe du Sud et d'Afrique du Nord. Contrairement aux autres XP, les patients XP-C ont très rarement des problèmes neurologiques (5 sur 122 individus répertoriés dans la littérature) à la différence des risques très accrus de développer des cancers non seulement cutanés mais également colorectaux, du poumon ou du sein. Tous les patients XP-C ont un GG-NER déficient qui corrèle très souvent avec un niveau d'expression très bas d'ARNm codant pour XPC (5 à 10% de la normale).

Peu d'études ont traité du rôle transcriptionnel de XPC et de son impact sur l'étiologie des patients XP-C. Nous savons cependant que le recrutement de ce facteur NER au niveau du promoteur a été corrélé à un ensemble de PTMs au niveau des histones formant un code qui régule l'accessibilité à l'ADN ainsi que l'environnement chromatinien au moment de la transcription (Le May et al., 2010a; Smith and Shilatifard, 2010) . XPC a été de plus identifié dans un complexe co-activateur des facteurs de transcription Oct4/Sox2 et que son absence a pour effet d'inhiber la pluripotence et d'accélérer la différenciation cellulaire des cellules ES (Fong et al., 2011). Pour comprendre le rôle de XPC en transcription à l'échelle du génome, nous avons donc choisi de déterminer sa localisation génomique par immunoprécipitation de la chromatine couplée à du séquençage haut débit (ChIP-seq), son influence sur le transcriptome par RNA-seq et d'identifier ses partenaires par spectrométrie de masse.

1. Le senseur du dommage à l'ADN XPC est un cofacteur de l'ARN polymérase II recrutant le complexe ATAC aux promoteurs en interagissant avec E2F1.

Nos données de RNA-seq combinées à celles de ChIP-seq ciblant XPC et pol II obtenues à partir de cellules de patients XP-C plus ou moins restaurées par XPC sauvage ont permis de déterminer la localisation génomique du facteur NER ainsi que les gènes ciblés. En résumé, XPC est détecté et colocalise avec l'ARN pol II majoritairement sur les promoteurs régulant de manière positive et négative plus de 500 gènes. L'analyse Gène Ontologique (GO) indique que ces gènes sont associés à la régulation de la chromatine, à des suppresseurs de tumeur

mais également à l'immunité. L'analyse par ChIP-seq de différentes marques d'histones indique que XPC est important pour la formation d'euchromatine dont les modifications de l'histone H3 incluant la triméthylation de la lysine 4 (H3K4me3) et l'acétylation de la lysine 9 (H3K9ac). Dans les cellules de patients XP-C, l'absence de XPC sur les promoteurs des gènes normalement activés corrèle avec une diminution de leur expression associée à un défaut dans le recrutement de la Pol II et la présence de H3K9ac. Nous avons identifié une interaction entre XPC et l'histone acétyl-transférase (HAT) KAT2A qui conditionne spécifiquement le recrutement du complexe coactivateur ATAC au niveau des promoteurs des gènes transactivés. Nous avons en outre montré qu'une forte signature E2F1 caractérise les promoteurs des gènes liés par XPC/KAT2A et que XPC interagit avec E2F1 favorisant sa liaison aux promoteurs. L'ensemble de nos données révèle que le facteur de réparation XPC est également un cofacteur de l'ARN pol II recrutant le complexe coactivateur ATAC aux promoteurs en interagissant avec le facteur de transcription de liaison à l'ADN E2F1. Sur ce projet, j'ai produit, purifié et caractérisé les différentes protéines recombinantes utilisées. J'ai également étudié les complexes XPC/KAT2A/E2F1 par les approches *in vivo* et *in vitro* de co-immunoprecipitation.

2. Le facteur NER XPC via son interaction avec l'histone variant H2A.Z régule son acétylation et la transcription dépendante de BRD2.

Nous avons réalisé une analyse protéomique de XPC. Parmi les partenaires identifiés en spectrométrie de masse, nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'interaction potentielle entre XPC et le variant d'histone H2A.Z. Ce variant de la forme canonique H2A dans les nucléosomes a été impliqué dans diverses fonctions incluant l'activation et la répression transcriptionnelle (Soboleva et al., 2014). H2A.Z est distribuée au niveau des promoteurs et aiderait à créer un promoteur accessible à la machinerie transcriptionnelle. Nous avons montré par des approches de co-immunoprécipitation *ex vivo* et *in vitro* que XPC et H2A.Z interagissent de manière directe. Nous avons de plus identifié par ces mêmes approches les domaines importants sur XPC et H2A.Z pour permettre leur interaction. Enfin, des expériences de ChIP-seq ciblant XPC et H2A.Z à partir de cellules XP-C plus ou moins restaurées par XPC sauvage ont permis de montrer une co-localisation des 2 protéines sur les promoteurs ciblés par le facteur NER. Tout comme les histones canoniques, H2A.Z est également sujet à des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation (Valdés-Mora et al., 2012). L'une des enzymes responsables de cette acétylation de H2A.Z (H2A.Zac) est KAT2A (GCN5 chez la levure) et partenaire de XPC avec E2F1. La comparaison des données de ChIP-seq pour H2A.Zac entre les cellules XP-C et restaurées a montré une diminution de l'acétylation du

variant en l'absence de XPC uniquement sur les gènes préalablement identifiés comme activés par XPC et co-régulés par KAT2A et E2F1. Des approches *ex vivo* et *in vitro* ont permis de montrer que le complexe XPC/KAT2A/E2F1 interagit et acétyle H2A.Z. Enfin l'inactivation de KAT2A soit par silencing soit par l'ajout de drogue inhibant son activité enzymatique récapitule l'absence de XPC sur H2A.Zac. De manière intéressante, H2A.Zac est associée au recrutement sur les promoteurs du coactivateur BRD2 corrélé aux gènes actifs (Vardabasso et al., 2015). Nous avons pu montrer que l'acétylation de H2A.Z au niveau des promoteurs régulés par XPC/KAT2A/E2F1 conditionne le recrutement de BRD2 et qu'en l'absence de XPC ce coactivateur n'est plus présent récapitulant son inhibition par des drogues spécifiques telles que JQ1 ou BIC-II. L'ensemble de nos données montre qu'en plus de son rôle dans la NER, XPC via KAT2A et E2F1, régule l'acétylation du variant d'histone H2A.Z lors de la transcription des gènes BRD2 dépendants. Ce second projet a été mon sujet principal.

3. Des mutations des gènes XPC et XPA chez des patients xeroderma pigmentosum Algériens conduisent à des dérégulations à la fois de la NER et de la transcription.

En collaboration avec le Dr Laugel du CHU de Strasbourg et le Dr Serradj du service de dermatologie de l'EHU d'Oran en Algérie, nous avons aidé à diagnostiquer et caractériser 2 patients âgés de 19 et 10 ans présentant un tableau clinique suggérant fortement XP. Des biopsies de peau ont été effectuées sur ces patients et leur mère. Nous avons pu établir, analyser les fibroblastes issus des biopsies et caractériser les défauts génétiques des 2 patients. Ainsi nous avons identifié pour l'un des patients une mutation homozygote sur le gène *XPC* (*XPC* p.Val548Alafs*25) alors que le second patient présente une mutation homozygote du gène *XPA* (*XPA* p.Arg228*). Le patient XP-C présente un important RNA decay conduisant à l'absence de la protéine XPC alors que pour le patient XP-A l'expression d'ARN est modérément altérée conduisant à la détection d'une protéine tronquée. Nous avons de plus montré un défaut de la NER et caractérisé l'étape déficiente pour les 2 patients. Enfin, nous avons étudié la transcription dans les fibroblastes issus des patients et avons observé une dérégulation de gènes préalablement identifiés comme cibles des facteurs NER, notamment le suppresseur de tumeur *DAPK1*. Ce travail a permis, outre de diagnostiquer de nouveaux patients, de caractériser au niveau moléculaire l'étiologie de ces XP en démontrant des défauts aussi bien au niveau de la réparation de l'ADN que de la transcription. Sur ce projet, j'ai étudié la transcription dans les fibroblastes issus des patients et de leurs mères et j'ai caractérisé le défaut d'expression de plusieurs gènes cibles de XPC.

Conclusions :

Les résultats obtenus durant ma thèse décrivant les mécanismes de régulation transcriptionnelle par le facteur NER XPC vont conduire à de nouvelles opportunités scientifiques en contribuant :

- à une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux de l'expression des gènes.
- à affiner l'étiologie du *Xeroderma Pigmentosum* et donc mieux expliquer leurs phénotypes notamment leur propension à développer des cancers via l'identification de gènes importants tels que des suppresseurs de tumeur.
- à utiliser et développer de nouvelles technologies nous donnant accès à une compréhension à l'échelle génomique et protéomique de XPC sur le remodelage de la chromatine.
- à élaborer des outils diagnostiques basés sur nos résultats qui peuvent résulter à terme à une meilleure prise en charge ainsi qu'au développement d'approches thérapeutiques.

L'amélioration des connaissances concernant les protéines qui participent et régulent non seulement la transcription mais également la réparation de l'ADN comme XPC et plus globalement les facteurs NER est cruciale pour comprendre l'étiologie de cancers et des mécanismes de protection contre la carcinogenèse dans la population. Comprendre comment les facteurs NER agissent dans les cellules humaines s'est révélé être un formidable challenge pour moi.

Index des figures

<u>Figure 1</u> : Les différentes lésions de l'ADN et les voies de réparation	17
<u>Figure 2</u> : Les lésions CPDs et 6-4 PPs	19
<u>Figure 3</u> : Schéma de la GG-NER	21
<u>Figure 4</u> : Schéma de la TC-NER	23
<u>Figure 5</u> : Schéma de l'organisation d'un gène de classe II	26
<u>Figure 6</u> : Structure de l'ARN pol II	28
<u>Figure 7</u> : Phosphorylation du CTD	29
<u>Figure 8</u> : Organisation d'un promoteur	33
<u>Figure 9</u> : Schéma de l'initiation de la transcription	36
<u>Figure 10</u> : Schéma d'un nucléosome	38
<u>Figure 11</u> : Schéma des différents niveaux de condensation de la chromatine	39
<u>Figure 12</u> : Différence de structure entre un nucléosome canonique et un nucléosome contenant H2A.Z	43
<u>Figure 13</u> : Schéma des modifications post-traductionnelles des histones dans un nucléosome	45
<u>Figure 14</u> : Schéma de l'acétylation d'une lysine	45
<u>Figure 15</u> : Schéma de la méthylation d'une lysine	49
<u>Figure 16</u> : Schéma de la phosphorylation d'une sérine	51
<u>Figure 17</u> : Mécanisme de déméthylation active d'une cytosine	53
<u>Figure 18</u> : Schéma du récepteur à l'acide rétinoïque	54
<u>Figure 19</u> : Relation entre les maladies et les gènes de la NER	57
<u>Figure 20</u> : Schéma récapitulatif des résultats	72
<u>Figure 21</u> : KAT2A et E2F1 se retrouvent associés à la GG-NER	75

Index des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Composition de l'ARN pol II	27
<u>Tableau 2</u> : Les éléments régulateurs de la transcription	31
<u>Tableau 3</u> : Variants d'histones, leurs localisation et régulation par les chaperonnes et les complexes de remodelage de la chromatine	42
<u>Tableau 4</u> : Liste des différentes modifications post-traductionnelles connues	44
<u>Tableau 5</u> : Les différentes classes de HAT	46
<u>Tableau 6</u> : Les différents groupes de HDAC	48
<u>Tableau 7</u> : Les différents groupes de HMT	50
<u>Tableau 8</u> : Les facteurs de réparation dans la transcription	63

Abréviations

6-4 PP	6-4 pyrimidine pyrimidone
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
5caC	5 carboxylcytosine
5hmC	5-hydroxyméthylcytosine
5hmu	5 hydroxyméthyluracil
5mC	5 méthylcytosine
Å	Angstrom (unité)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AID/APOBEC	Activation induced cytidine deaminase/APOBEC
ARN	Acide ribonucléique
ARN pol II	ARN polymérase II
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATAC	Ada2a containing complexe
ATP	Adénosine triphosphate
ATRA	Acide tout trans-rétinoïque
BER	Réparation par excision de base
BIDS	Brittle hair and nails, intellectual impairment, decreased fertility and short stature
BRD	Bromodomaine
BRE	Site de reconnaissance de TFIIIB
CAK	CDK-Activated kinase
CDK7	Cyclin dependante kinase 7
CENP-A	H3 like centrometric protein A
COFS	Syndrome cérébro oculo facto skeletal
CPD	Dimère de cyclobutane pyrimidine
CPE	Core promoter element
CS	Syndrome de Cockayne
CS I/II/III	Syndrome de cockayne classe I/II/III
CSA/B	Cockayne syndrome A/B
CSN	COP9 signalosome complex
CTD	C-terminal domain
CUL4A	Cullin-4A
Cyclo-dA	8,5'-cyclopurine-2'-deoxyadenosines
Cyclo-dG	8,5'-cyclopurine-2'-deoxyguanosines
DBD	Domaine central de liaison
DCE	Downstream core element
DDB1/2	Protein damage DNA binding 1/2
DNMT	DNA methyltransferase
DPE	Downstream promoter element
ER	Récepteur aux oestrogènes

ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair
FEN1	Flap endonucléase 1
G	Glycine
GG-NER	Réparation globale du génome
GNAT	GCN5 related N-acetyl
GR	Récepteur aux glucocorticoïde
H2BFWT	H2B type WT
HAT	Histone Acétyl-transférase
HDAC	Histone déacétylase
HMGN1	Non-histone chromosomal protein HMG
HMT	Histones méthyl-transférase
HR	Réparation par recombinaison homologue
HR23B	Homologue Rad23B
IBIDS	Icthyosis, brittle hair and nails, intellectual impairment, decreased fertility and short stature
Inr	Élément initiateur
JMJD	JMJC jumonji domain
K	Lysine
KAT2A	Lysine acétyltransferase 2A
LDB	Domaine de liaison au ligand
LSD1	Lysine specific demethylase 1
MAT1	Protéine ménage à trois 1
MBP	Methyl binding protein
MMR	Réparation des mésappariements
MTE	Motif Ten element
MYST	MOZ, YBF2/SAS3, SAS2 and TIP60 protéin
NCoR	Nuclear receptor co-repressor
NER	Réparation par excision de nucléotide
NHEJ	Réparation par ligation des extrémités non homologues
NTD	Domaine N-terminal
PADI4	Peptidyl-arginine deiminase 4
PCAF	P300/CBP associated factor
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PHMT	Protein lysine methyltransferase
PIBIDS	Photosensitivity, ichthyosis, brittle hair and nails, intellectual impairment, decreased fertility and short stature
PIC	Complexe de pré-initiation
PolyA	Poly-adénylation
PR	Récepteur à la progésterone
PRMT	Protein arginine methyltransferase
pTEFb	Positive transcription elongation factor b
R	Arginine
RARE	Retinoic acid response element
RFC	Replication factor C

ROC1	Regulator of cullins 1
RPA	Replication protein A
Rpb1/12	RNA polymerase II subunit 1/12
RRS	Recovery of DNA synthesis after DNA damage assay
RT	Récepteur aux hormones thyroïdiennes
Rtr1	RNA polymerase II subunit B1 CTD phosphatase
RXR	Récepteur à l'acide rétinoïque
S	Sérine
SAGA	Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase
SAM	Méthionine S-adenosyl
SMRT	Silencing mediator of retinoic and thyroid receptor
Sox2	(Sex determining region) Y box 2
SWI/SNF	Switch/Sucrose non fermentable
T	Thréonine
TAF	TATA box binding protein associated factor
TBP	TATA binding protein
TC-NER	Réparation couplée à la transcription
TDG	Thymine DNA glycolase
TET	Ten eleven translocation
TFIIA/S	Facteur de transcription II A/S
TSS	Transcription Start site
TTD	Trichothiodystrophie
UDS	Unscheduled DNA synthesis
USP7	Ubiquitin specific protease 7
UV	Ultraviolet
UV-DDB	UV-damaged DNA-binding protein
UVC	Ultraviolet C
UVSSA	UV stimulated scaffold protein A
VDR	Récepteur à la vitamine D
XAB2	XPA binding protein 2
XCPE1	X core promoter element 1
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA/V	Xeroderma pigmentosum A/V
Y	Tyrosine

Introduction

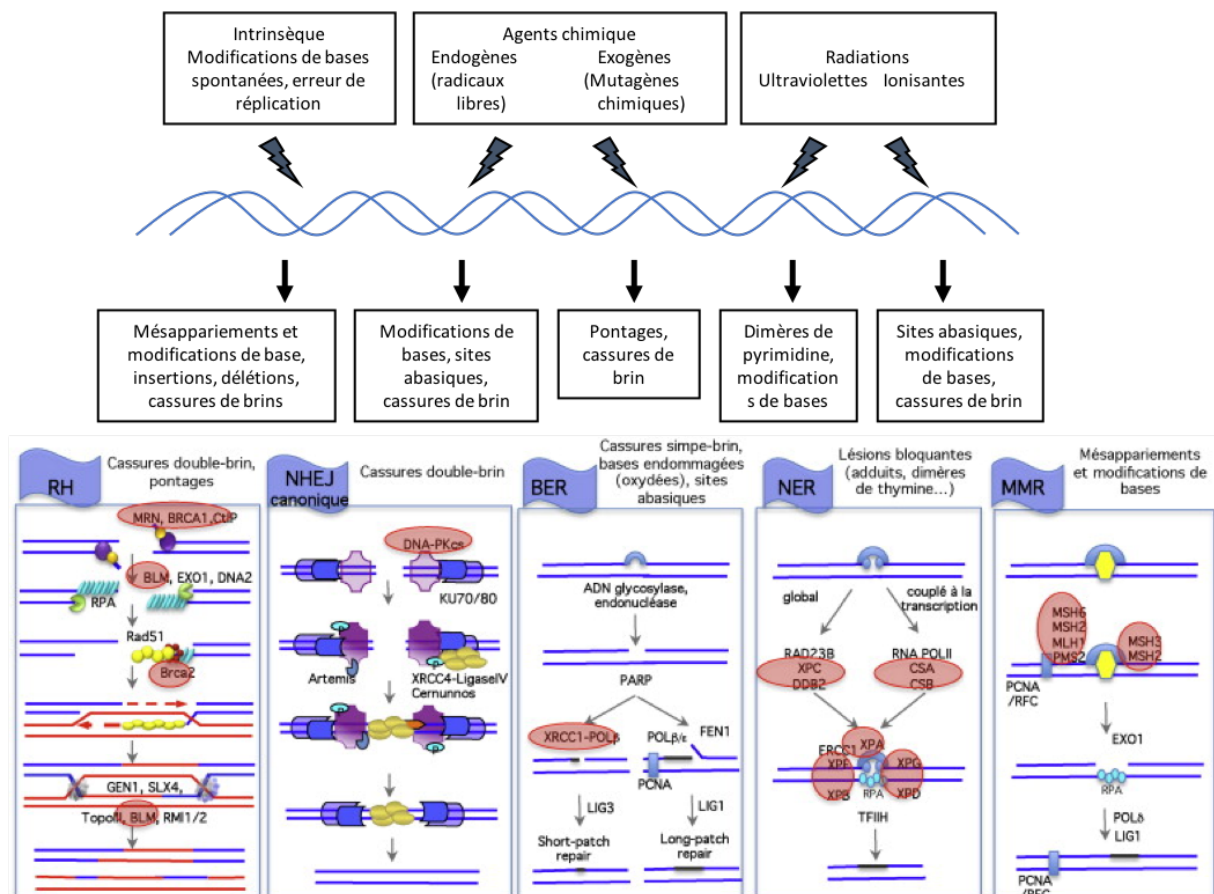


Figure 1 Les différentes lésions de l'ADN et les voies de réparation : Les lésions de l'ADN peuvent être engendrées par différents stress génotoxiques. Ces lésions seront réparées en fonction de leurs types. Adaptée de (Rass et al., 2012)

Introduction

L'expression des gènes est constamment compromise par le stress génotoxique qui remet en cause l'intégrité du génome. Il existe plusieurs voies de réparation de l'ADN pour éliminer ces lésions. Cela implique une connexion entre la transcription et la réparation de l'ADN pour orchestrer l'expression et la réparation des gènes. Un lien entre la réparation et la transcription de l'ADN a été établi après la découverte d'une voie de la réparation, la réparation par excision de nucléotide (NER), supprimant les lésions de l'ADN localisées sur le brin activement transcrit (TC-NER), bloquant alors l'ARN polymérase II (Mellon et al., 1987). S'en est suivi la caractérisation de TFIIH comme un facteur NER impliqué à la fois dans la TC-NER et dans la réparation globale du génome (GG-NER), en éliminant les dommages de l'ADN de l'ensemble du génome (Feaver et al., 1993; Schaeffer et al., 1993). Les différentes voies de réparation existantes comprennent plus de 130 protéines (Hoeijmakers, 2001).

1) La réparation de l'ADN : la voie NER

A) Les différentes voies de réparation de l'ADN

Ces différentes voies de réparation de l'ADN s'activent en fonction du type de lésion présent sur l'ADN. Les études ont permis de mettre en évidence 5 voies de réparation (**Figure 1**). La voie de réparation des mésappariements (MMR) corrige les erreurs faites par les ADN polymérases lors de la réplication de l'ADN. La réparation par la recombinaison homologue (HR) et par ligation des extrémités non homologues (NHEJ) sont les voies qui prennent en charge les cassures double-brins de l'ADN. L'excision de base (BER) élimine les bases chimiquement modifiées et les cassures simple brin. Enfin la réparation par excision de nucléotides (NER) élimine la majorité des dommages qui sont induits par les UVs ou les adduits volumineux. Le laboratoire du Dr Coin travaille exclusivement sur cette voie de réparation et ses protéines.

B) Les dommages reconnus par la NER

La NER est le mécanisme de réparation qui va prendre en charge plusieurs variétés de dommage de l'ADN causées par les rayonnements UV mais aussi les composés anti-cancéreux (Gillet and Schärer, 2006). Concernant les lésions causées par les UV, il y en a de 2 types : les dimères cyclobutanes de pyrimidines (CPDs) et les photoproduits 6-4 pyrimidine pyrimidone (6-4 PPs) (**Figure 2**) (Glickman et al., 1986; Setlow and Carrier, 1966). Dans 70% des cas, ce sont les CPD qui se forment par une liaison covalente entre 2 thymines, 2 cytosines

ou bien entre une thymine et une cytosine en fonction de la longueur d'onde. Les CPDs provoquent une distorsion d'environ 15° de l'hélice d'ADN avec quasiment aucune altération de l'appariement des bases, alors que la distorsion provoquée par les 6-4PPs peut aller jusqu'à 44°, ce qui provoque une rupture d'appariement entre les bases (Kim et al., 1995; Lee et al., 2004). La NER peut aussi prendre en charge et éliminer des composés chimiques capables de se fixer sur l'ADN et d'en modifier la conformation. Comme composé, on retrouve des anticancéreux comme le cisplatine et ses dérivés, des hydrocarbures poly-cycliques aromatiques, la fumée de cigarette ou encore des amines aromatiques. La NER est aussi impliquée dans l'élimination de dommages oxydatifs tels que les 8,5'-cyclopurine-2'-deoxyadenosines (cyclo-dA) ou 8,5'-cyclopurine-2'-deoxyguanosines (cyclo-dG) (Mocquet et al., 2007). Ces derniers sont formés suite à l'attaque spécifique d'un radical hydroxyle, ciblant la position 2' d'une déoxyadénosine et d'une déoxyguanosine. Il semblerait que lors de la réparation, ces lésions ne soient pas reconnues en tant que tel, mais plutôt en fonction de certaines caractéristiques conformationnelles de l'ADN, comme la distorsion de l'ADN provoquée (Hess et al., 1997). Ceci expliquerait que les 6-4PPs soient réparés 5 fois plus vite que les CPDs alors qu'ils sont beaucoup moins nombreux mais plus distordants (Reardon and Sancar, 2003).

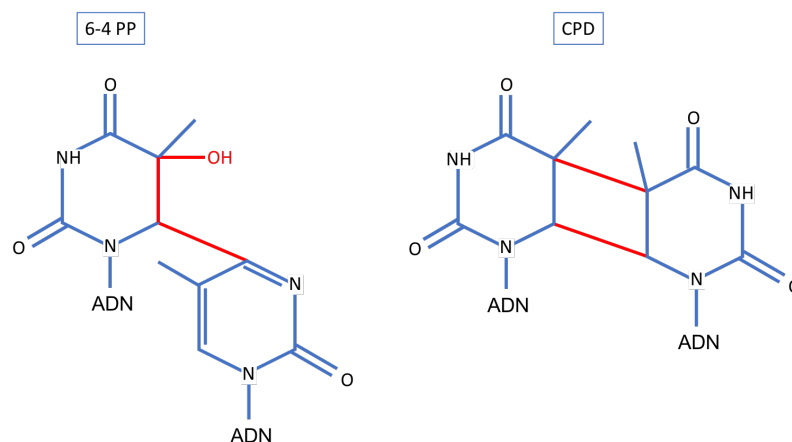


Figure 2 Les lésions CPDs et 6-4 PPs : Exemple d'une lésion CPD et d'un 6-4 PP entre deux thymines

C) Les deux sous-voies de la NER

La NER est divisée en 2 sous-voies : la réparation globale du génome (GG-NER) et la réparation couplée à la transcription (TC-NER). La GG-NER prend en charge les lésions se trouvant sur l'intégralité du génome, alors que la TC-NER seulement celles présentes sur le brin transcrit. Ces deux mécanismes se divisent en 5 étapes : la reconnaissance de la lésion, l'ouverture de l'ADN, la double incision, la resynthèse du brin puis la ligation du nouveau brin.

Cependant, les deux mécanismes diffèrent par la première étape, la reconnaissance du dommage.

a) La GG-NER

- Reconnaissance de la lésion

Dans la GG-NER, c'est la protéine XPC qui va permettre la reconnaissance de la lésion (**Figure 3**). Dans la cellule, XPC forme un hétéro-trimère avec HR23B (Sugasawa et al., 1996) et la centrine 2 (Araki et al., 2001). Ce complexe est essentiel pour le recrutement des autres composants de la machinerie NER, pour former le complexe de pré-incision de l'ADN (Wood et al., 2000). La centrine 2 et HR23B permettent de stabiliser le complexe, inhibent la poly-ubiquitination de XPC et le protègent de la dégradation par le protéasome (Ng et al., 2003).

Le mécanisme de reconnaissance des sites contenant un dommage par XPC n'est pas toujours bien définie. Il semblerait que XPC reconnaisse la structure secondaire de l'ADN et non pas la lésion en elle-même (Sugasawa et al., 2001, 2002). XPC est, en effet, constamment présent au niveau de la chromatine même en absence de dommage. Il pourrait « scanner » l'ADN afin de détecter les distorsions causées par les lésions (Hoogstraten et al., 2008). Cependant l'affinité de XPC est variable en fonction de la lésion. Il détecte très facilement les distorsions causées par les 6-4PPs contrairement à celle causées par les CPDs. C'est un complexe appelé UV-DDB, aussi impliqué dans la NER, qui va reconnaître les lésions de type CPD (Fitch et al., 2003). Ce complexe est un hétéro-dimère composé de DDB1 et DDB2 (Keeney et al., 1993). Il reconnaît les lésions CPDs situées sur le brin non transcrit (Scrima et al., 2008). La protéine DDB1 est aussi capable d'interagir avec une autre protéine, CUL4A et former ainsi un complexe E3 ligase, capable d'ubiquitiner de nombreuses protéines cibles (Higa et al., 2006). Ce complexe est recruté au niveau de l'ADN par DDB2. Ils vont former un nouveau complexe à eux trois et permettre alors l'ubiquitination de XPC et DDB2 (Takedachi et al., 2010). L'ubiquitination de DDB2 réduit son affinité avec le dommage et permet sa dégradation par le protéasome (Sugasawa et al., 2005). L'ubiquitination de XPC stabiliserait son interaction avec HR23B et augmenterait l'affinité de XPC pour l'ADN lésé (Ng et al., 2003). Il semblerait aussi que le complexe DDB1-CUL4A-DDB2 joue un rôle dans le remodelage de la chromatine (Kapetanaki et al., 2006).

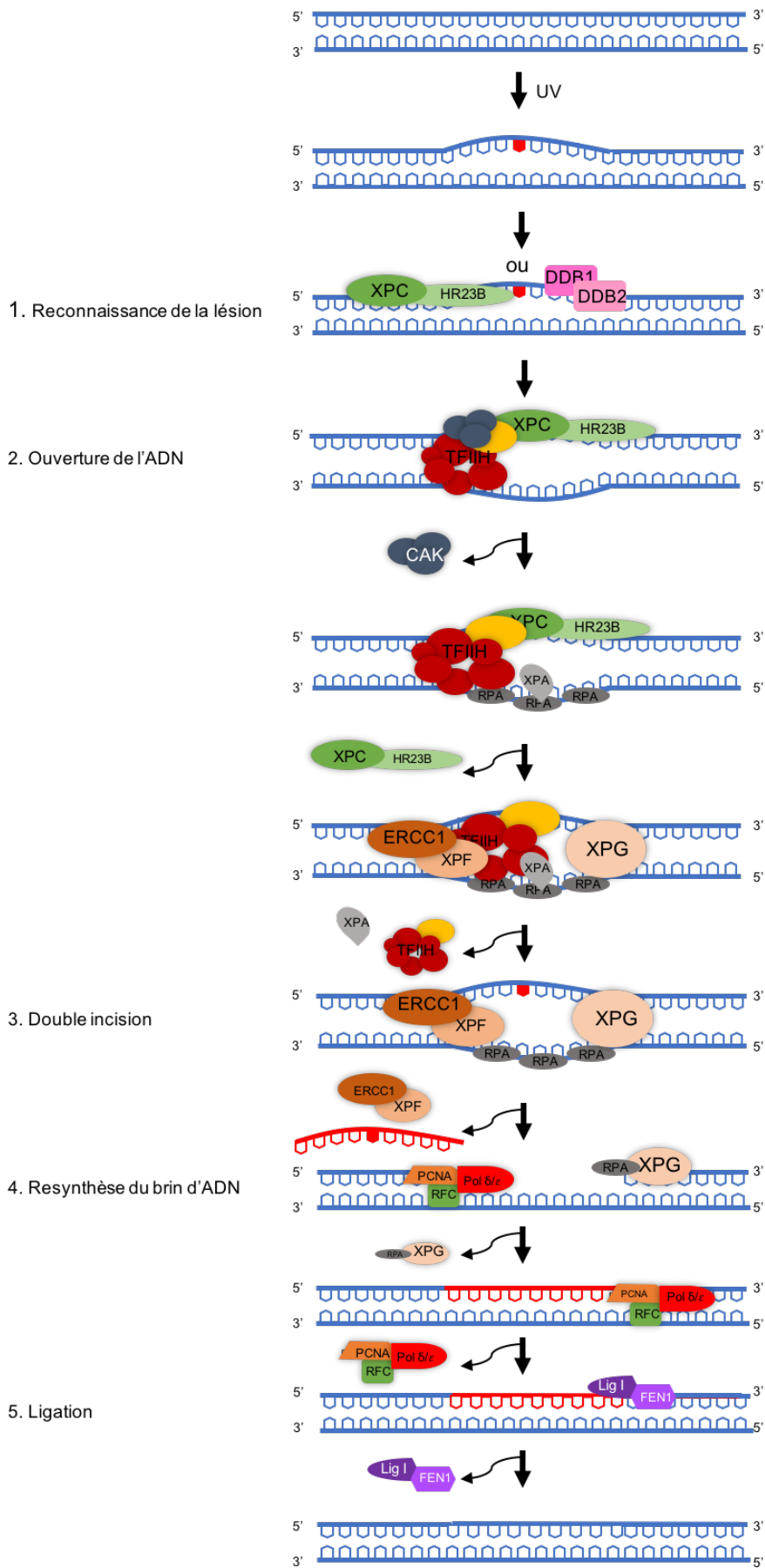


Figure 3 Schéma de la GG-NER

- Ouverture de l'ADN

Une fois que la lésion a été détectée par le complexe XPC, ce dernier va ouvrir partiellement la double hélice d'ADN et servir de plateforme de recrutement pour TFIIH (Volker et al., 2001). TFIIH est un facteur multifonctionnel connu surtout pour son rôle dans la transcription. Il est composé de 2 sous-complexes. Le premier, « corps » composé des sous-unités XPB, p63, p52, p44, p34 et p8/TTD-A, et le deuxième, CAK (CDK-activating kinase) composé des sous-unités CDK7, MAT1 et la cyclin H. Ces deux sous-complexes sont maintenus ensemble par la protéine XPD (Roy et al., 1994; Zhou et al., 2013). TFIIH est capable d'ouvrir la double hélice de l'ADN grâce à ces deux hélicases ATP dépendantes, XPB et XPD. L'activité ATPase de XPB permet l'ancrage de TFIIH sur l'ADN et l'activité hélicase 5'-3' de XPD provoque l'ouverture de la double hélice d'ADN (Coin et al., 2006; Oksenyich et al., 2009). Suite à cette ouverture, la protéine RPA est recrutée sur l'ADN simple brin. Elle va permettre de protéger le brin non endommagé de potentielles attaques de protéines nucléasiques. Cela permet aussi le maintien de la configuration ouverte de la double hélice. Par la suite, la protéine XPA est recrutée, favorisée par la sous-unité p8 de TFIIH. Ce recrutement permet la dissociation du CAK de TFIIH (Coin et al., 2008), et sera suivi par l'arrivée du facteur d'excision XPG. Le complexe de pré-incision est alors assemblé autour du dommage (RPA, XPA et XPG) (Zotter et al., 2006).

- La double incision

Le recrutement de l'endonucléase XPG en 3' au niveau de la lésion provoque le relargage de XPC (Riedl et al., 2003) puis le recrutement de l'endonucléase XPF/ERRCC1 en 5'. Sa mise en place au niveau de la lésion déclenche le départ de TFIIH (Riedl et al., 2003). L'action conjointe des deux endonucléases, XPG et XPF/ERRCC1 va mener à l'incision d'un fragment de 24 à 32 nucléotides contenant le dommage (Hess et al., 1997). Après cette double incision, le facteur XPA est relargué de l'ADN pour être recyclé dans un nouveau complexe. Seul le facteur RPA et les deux endonucléases restent sur l'ADN et protègent le brin non endommagé (Overmeer et al., 2011; Riedl et al., 2003).

- Resynthèse de l'ADN

L'excision du fragment d'ADN contenant la lésion fait place au recrutement de la machinerie de réplication (Mocquet et al., 2008). Cette étape est étroitement coordonnée avec la double incision de XPG et XPF/ERRCC1. L'incision en 5' doit avoir eu lieu pour pouvoir permettre le recrutement de PCNA via XPG et de RFC par RPA. Cette étape permet le relargage de l'endonucléase XPF/ERRCC1. Les facteurs XPG, RPA, RFC et PCNA servent de plateforme de

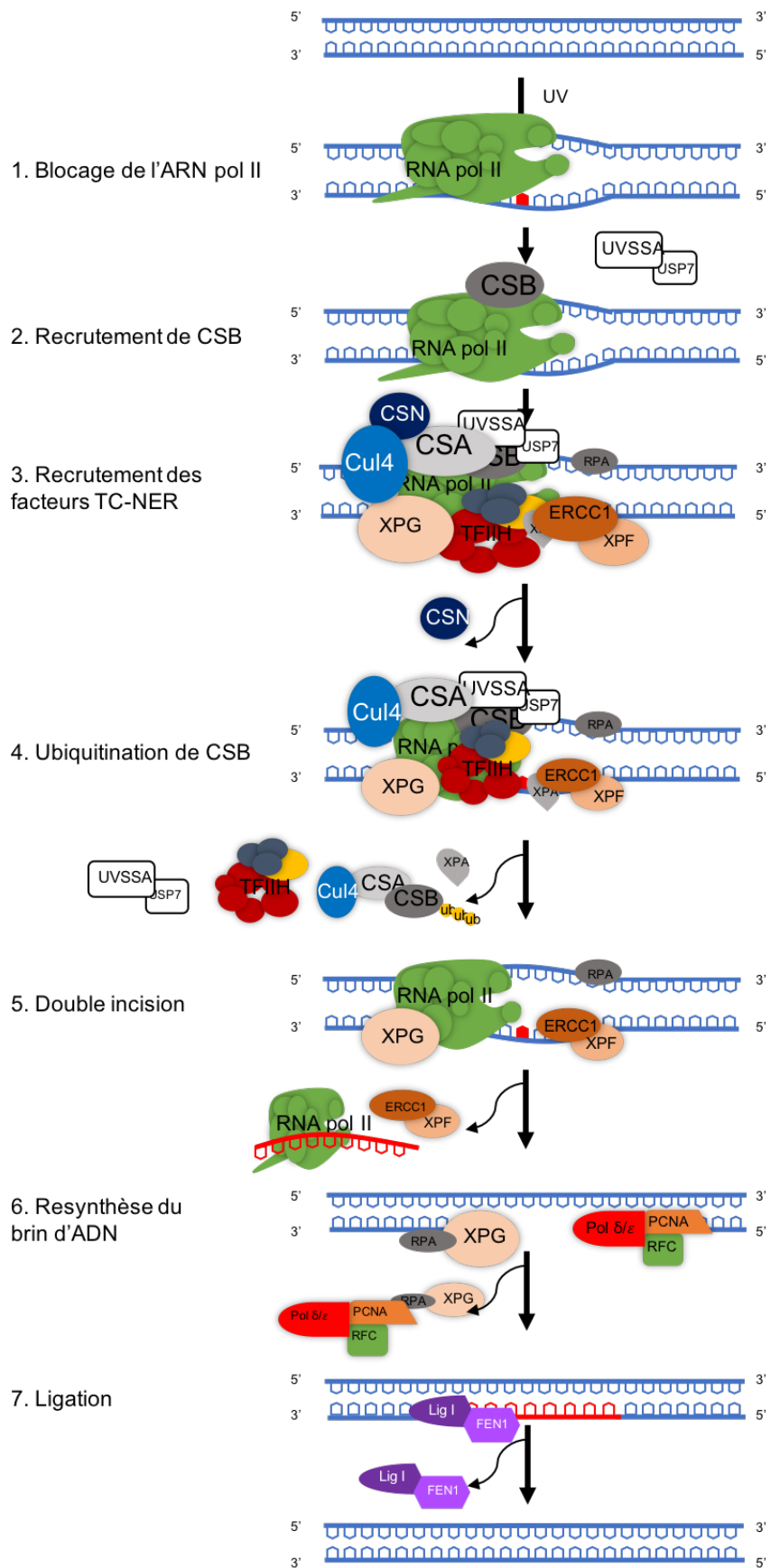


Figure 4 Schéma de la TC-NER

recrutement pour le recrutement de l'ADN polymérase (pol δ , pol κ ou pol ϵ) (Aboussekhra et al., 1995). L'exclusion de XPG et RPA initie alors la phase de resynthèse qui utilise le brin non endommagé comme matrice.

- La ligation

Une fois le nouveau brin synthétisé, il faut le lier à l'ADN préexistant. Il existe plusieurs ADN ligases (I, II et III) qui peuvent faire la ligation. Il a été montré que la pol δ avec la ligase II vont se charger de la synthèse et la ligation lors du cycle cellulaire alors que la pol ϵ et la ligase I les feront dans les cellules quiescentes (Moser et al., 2007).

b) La TC-NER

La TC-NER va spécifiquement réparer les lésions de l'ADN présentes sur le brin transcrit. Comme son nom l'indique, elle prend place lorsque l'ARN polymérase II se retrouve bloquée dans sa progression par une lésion (**Figure 4**). Son arrêt permet de localiser les dommages et de déclencher le mécanisme de réparation (Mellon et al., 1986). Lors de l'arrêt, l'ARN polymérase II peut être polyubiquitinée et dégradée par le protéasome (Selby and Sancar, 1994) ou arrêtée au niveau de la lésion pendant la réparation (Lainé and Egly, 2006; Tremeau-Bravard et al., 2004). L'arrêt de l'ARN polymérase II va induire le recrutement de deux facteurs spécifiques de la TC-NER, CSA et CSB.

CSB est un facteur clé, qui en se liant avec l'ARN pol II va permettre le recrutement des autres facteurs comme TFIIH, RPA, XPA et les endonucléases (Fousteri et al., 2006). Ce complexe de pré-incision alors formé ouvre l'ADN autour de la lésion pour permettre la double incision. CSB est un facteur faisant partie de la famille des facteurs SWI/SNF remodelant la chromatine de façon ATP dépendante (Troelstra et al., 1992). In vitro, il remodèle la chromatine en interagissant directement avec le cœur des histones (Citterio et al., 1998). CSB est nécessaire pour le recrutement de l'acétyl-transférase p300 et de CSA au niveau du dommage.

CSA fait partie du complexe E3 ubiquitine ligase contenant les protéines CUL4, DDB1 et ROC1 régulé par CSN (COP9 signalosome complex) (Groisman et al., 2003). CSA en interagissant avec CSN n'a pas d'activité ubiquitine ligase propre. Ce n'est qu'après le relargage de CSN, que CSA pourra ubiquitiner CSB afin de permettre sa dégradation et le retour de la synthèse d'ARN après réparation (Groisman et al., 2006). CSA va permettre le recrutement d'autres facteurs additionnels de la TC-NER : la protéine d'interaction nucléosomale HMGN1, le facteur de transcription TFIIIS et le facteur de splicing XAB2 (XPA binding protein 2) (Fousteri et al., 2006). Le recrutement de p300 et de HMGN1 faciliterait le remodelage de la chromatine et permettrait la translocation de l'ARN pol II pour favoriser

l'élimination du dommage et le redémarrage de la transcription (Hanawalt and Spivak, 2008). Concernant TFIIIS il stimulerait l'activité de clivage de l'ARN pol II dans la TC-NER afin de provoquer son arrêt. Cela permettrait le redémarrage de l'élongation après l'élimination de la lésion. Cependant, deux nouvelles protéines ont été identifiées comme nouveaux facteurs de la TC-NER : UVSSA et USP7. UVSSA va reconnaître CSB au niveau de la lésion et permettre le recrutement de USP7. Ensemble ils vont stabiliser CSB et le protéger de l'ubiquitination (Schwertman et al., 2012, 2013).

Une fois la lésion reconnue et le complexe de pré-incision formé, CSB est ubiquitinée et relarguée avec XPA et TFIIH. Comme dans la GG-NER, la double incision est alors effectuée et PCNA est recrutée sur l'ADN pour former avec RFC et les DNA polymérases (δ , ϵ , κ) le complexe de resynthèse. Finalement la ligation est effectuée par l'ADN ligase I et FEN1, permettant ainsi le redémarrage de la transcription.

Ces voies de réparation permettant de garder l'intégrité du génome afin que des processus comme la réplication de l'ADN, la transcription des gènes, puissent avoir lieu sans problèmes. En effet, lors de la transcription, si des lésions ou des erreurs de réplication sont présentes sur le brins transcrits cela peut mener à la production de protéines modifiées qui pouvant altérer la vie de la cellule.

II) La transcription des gènes de classe II : modèle des gènes régulés par le récepteur à l'acide rétinoïque.

L'expression des gènes est un processus fortement régulé dans la cellule. La transcription est l'étape pendant laquelle une ARN polymérase (ARN pol) aidée par d'autres protéines va transcrire les gènes en ARN.

Chez les eucaryotes, il existe cinq ARN polymérases capables de synthétiser l'ARN tandis qu'une seule est retrouvée chez les procaryotes et les archées (Louis and Fitt, 1971; Roeder and Rutter, 1969). L'ARN polymérase I intervient dans la transcription des ARN ribosomiques (ARNr) sauf pour l'ARNr 5S. Les gènes transcrits par cette ARN pol I sont appelés des gènes de classe I. L'ARN polymérase III est impliquée dans la synthèse des ARN de transfert (ARNt) et de l'ARNr 5S (Roeder and Rutter, 1970) ayant lieu essentiellement pendant l'interphase du cycle cellulaire. Les gènes transcrits par cette ARN pol III sont donc les gènes de classe III. Les ARN polymérases IV et V sont spécifiques des plantes et ont pour rôle la transcription des

petits ARNs impliqués dans le silencing des gènes (Pikaard et al., 2008; Zhou and Law, 2015). L'ARN polymérase II est responsable de la synthèse des ARN messager (ARNm) codant pour les protéines, de la majorité des petits ARNs nucléaires et des micro-ARNs (Kornberg, 1999; Sims et al., 2004). Les gènes transcrits par l'ARN pol II sont dit des gènes de classe II (**Figure 5**). Dans cette thèse nous nous intéressons uniquement à ces gènes.



Figure 5 Schéma de l'organisation d'un gène de classe II

La transcription nécessite donc le recrutement au niveau du promoteur des gènes activés, d'autres protéines que l'ARN pol II incluant les facteurs généraux de transcription (TFIIA, -B, -C, -D, -E, -F, -H), le Médiateur, des co-activateurs, des protéines de remodelage de la chromatine. La transcription des gènes de classe II est un processus qui se divise en trois grandes étapes : l'initiation, l'élongation, et la terminaison.

Avant de décrire plus longuement le processus de transcription, je vais dans un premier temps présenter les différents acteurs de la transcription.

A) Généralités

a) L'ARN polymérase II

L'ARN polymérase II est l'enzyme catalytique clé du complexe de pré-initiation de la transcription. C'est un complexe formé de 12 sous-unités nommées Rpb1 à Rpb12, avec un poids total de 515 kDa (**Tableau 1**). En général, les 12 sous-unités de l'ARN pol II sont hautement conservés au niveau de leurs séquences, fonctions et architecture entre l'Homme, les bactéries et la levure. En effet, Rpb1, 2, 3, 6 et 11 sont liés respectivement aux sous-unités β' , β , α , ω , et α de l'ARN polymérase bactérienne (Minakhin et al., 2001; Tan et al., 2000a). De plus, les sous-unités Rpb5, 6, 8, 10 et 12 sont communes à l'ARN polymérase I et III, tandis que Rpb1, 2, 3 et 11 ont des séquences d'homologies avec leurs homologues dans l'ARN polymérase I et III (Hampsey, 1998; Woychik and Young, 1990). La résolution de la structure de l'ARN polymérase II a permis de mieux comprendre son organisation (Gnatt et al., 2001a; Woychik and Young, 1990).

L'ARN pol II peut être divisée en deux grands sous-complexes, le cœur composé de 10 sous-unités (Rpb1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11 et 12) et la queue formée par les deux dernières sous-unités Rpb4 et Rpb7 (**Figure 6**) (Minakhin et al., 2001; Tan et al., 2000b).

Les deux plus grosses sous-unités, Rpb1 et Rpb2, forment un sillon de 25 Å chargé positivement, dans lequel vient se loger l'ADN qui sera transcrit (Cramer et al., 2000, 2001).

	Sous-Unités	Fonctions
Coeur	Rpb1	Contient le CTD Impliqué dans la sélection du site d'initiation et dans l'élongation
	Rpb2	Contient le site actif Impliqué dans la sélection du site d'initiation et dans l'élongation
	Rpb3	Avec Rpb11, orthologue du dimère $\alpha 2$ chez la bactérie
	Rpb5	Commune à l'ARN pol I et III
	Rpb6	Commune à l'ARN pol I et III
	Rpb8	Commune à l'ARN pol I et III
	Rpb9	Impliqué dans la sélection du site d'initiation
	Rpb10	Commune à l'ARN pol I et III
	Rpb11	Avec Rpb3, orthologue du dimère $\alpha 2$ chez la bactérie
	Rpb12	Commune à l'ARN pol I et III
Queue	Rpb4	Impliqué dans l'initiation, forme un sous-complexe avec Rpb7
	Rpb7	Impliqué dans l'initiation, forme un sous-complexe avec Rpb4

Tableau 1 Composition de l'ARN polymérase II : Présentation des différentes sous-unités de l'ARN pol II et de leurs fonctions

Les sous-unités Rpb3, 6, 10, 11 et 12 sont rassemblées pour maintenir la structure. Le côté du sillon qui contient Rpb1 forme une pince mobile qui intervient dans l'initiation de la transcription pour empêcher l'ADN de se dissocier (Gnatt et al., 2001b). Rpb2 forme ce que l'on appelle « le mur » qui permet de délimiter l'extrémité du sillon. Rpb4 et Rpb7 forment un module ancré à la base de la pince Rpb1 et sont impliquées dans l'initiation de la transcription en permettant la fermeture de la pince mobile (Armache et al., 2003).

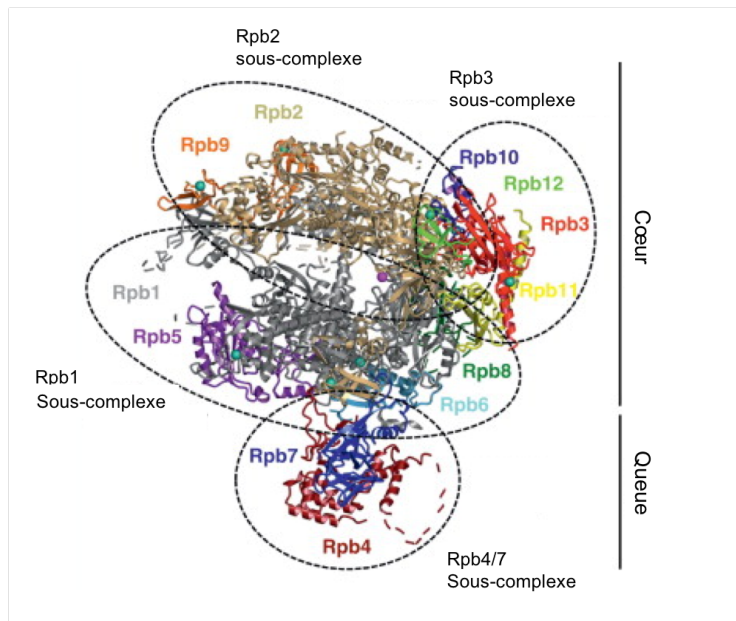


Figure 6 Structure de l'ARN pol II : Structure de l'ARN pol II par cristallographie aux rayons X (adapté de (Wild and Cramer, 2012))

L'ARN pol II se différencie des autres polymérase par la présence du domaine carboxy-terminal (CTD) de la sous-unité Rpb1. Le CTD se caractérise par une répétition d'un hepta-peptide : Y¹S²P³T⁴S⁵P⁶S⁷. Ce motif est très conservé dans l'évolution et on le retrouve aussi bien chez la levure, les plantes que chez l'être humain. La différence réside dans le nombre de répétition de ce motif entre les espèces (26 à 29 fois chez la levure, 42 fois chez la drosophile, 52 fois chez l'Homme) (Hampsey, 1998; Kang and Dahmus, 1995; Lee and Young, 2000). Le CTD semble être essentiel à la vie puisque les cellules contenant une ARN pol II avec moins de 10 répétitions de cet hepta-peptide ne sont pas viables chez la levure *S. cerevisiae* (Nonet and Young, 1989; Nonet et al., 1987).

Le CTD peut être phosphorylés à différents niveaux . Ces phosphorylations se font principalement sur les sérines 2, 5 et 7 des différentes répétitions (Dahmus, 1995). Cette dynamique de phosphorylation va permettre la progression de l'ARN pol II durant le processus de transcription (**Figure 7**). La phosphorylation de la sérine 5 est effectuée par CDK7 qui fait partie du facteur de transcription TFIIH. Elle permet l'échappée de l'ARN pol II (Serizawa et al., 1993). La phosphorylation de la sérine 2 s'effectue par la kinase CDK9 (du facteur d'élongation pTEFb) lors de l'élongation. Le CTD est donc hyper-phosphorylé et cela va permettre le bon déroulement de l'élongation avec l'ajout de la coiffe de l'ARNm. La majorité des sérines 5 phosphorylées sont ensuite déphosphorylées par la phosphatase Rtr1. Cela favorise la balance de phosphorylation en faveur de la sérine 2 et permet le début de la terminaison de la transcription (Mosley et al., 2009). Les phosphatases SCP1 et FCP1 vont

respectivement déphosphoryler les sérines 5, 2 et 7 restantes et ainsi permettre le recyclage de l'ARN pol II (Cho et al., 2001).

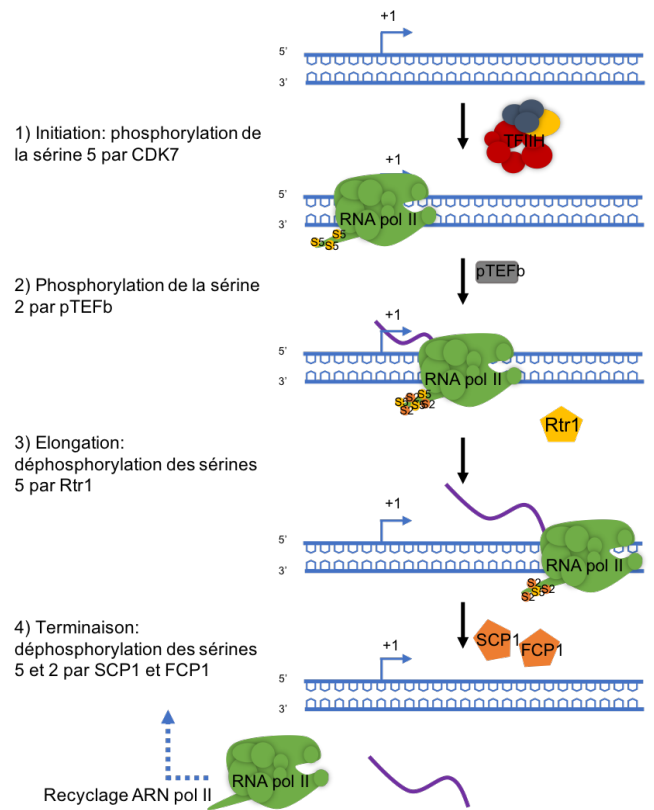


Figure 7 Cycle de phosphorylation du CTD de Rpb1 lors de la transcription

b) Les facteurs généraux de transcription

Les facteurs généraux de transcription sont les facteurs qui vont aider l'ARN pol II à réaliser l'initiation. Ils sont au nombre de 6 : TFIIA, B, D, E, F et H (Samuels et al., 1982).

- **TFIIA** : est un facteur composé de 3 sous-unités : α de 35 kDa, β de 19 kDa, et γ de 12 kDa. Ces trois sous-unités sont codées par 2 gènes : TFIIA $\alpha\beta$ et TFIIA γ (DeJong and Roeder, 1993). TFIIA est essentiel à la transcription (Reinberg and Roeder, 1987). La déplétion de TFIIA provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G2, ce qui amène à une forte diminution de la transcription des gènes (Kang and Dahmus, 1995).
- **TFIIB** : est un facteur de 33 kDa capable de se lier au promoteur via la protéine TBP (sous-unité de TFIID). Il est décrit comme étant nécessaire pour le recrutement de l'ARN pol II (Sawadogo and Roeder, 1985). Il peut se fixer sur le promoteur en interagissant avec le motif BRE^{up} (séquence régulatrice de l'ADN, voir II/A/c) et favorise la formation du complexe TFIIB/TBP/promoteur, ayant un effet positif sur la transcription (Lagrange et al., 1998). Mais la majeure partie des TFIIB vont interagir avec le motif BRE^{dw}. En plus de son

interaction avec TBP, TFIIB peut interagir avec l'ARN pol II et le facteur TFIIF, via sa partie N-terminale. TFIIB joue un rôle majeur dans la sélection du site d'initiation de la transcription (Li et al., 1994). Il est aussi impliqué dans la phosphorylation du CTD de l'ARN pol II en réprimant l'activité de la phosphatase FCP1 en interagissant avec celle-ci (Chambers et al., 1995; Kobor et al., 2000).

- **TFIID** : est le premier facteur général de transcription à se fixer sur le promoteur. C'est un complexe composé de la protéine TBP (TATA binding protein) et de 13 facteurs associés à TBP nommés TAF (TBP associated factor). TBP, comme son nom l'indique, va interagir avec la boîte TATA des promoteurs, alors que les TAFs vont interagir avec d'autres séquences régulatrices du promoteur comme Inr, DCE ou DPE (II/A/c). La composition de TFIID en TAFs varie selon le type de promoteur (Jacq et al., 1994). Les TAFs sont donc importants pour la sélection du promoteur et interviendraient comme des co-activateurs de la transcription (Burley and Roeder, 1996; Lee and Young, 2000). La protéine provoque une courbure de 90° de l'ADN lorsqu'elle se lie à celui-ci, provoquant le déroulement partiel de la double hélice d'ADN (Nikolov et al., 1996). Certains TAFs se retrouvent dans le complexe SAGA, connu pour réguler la transcription en remodelant l'environnement chromatinien.
- **TFIIE** : c'est un hétéro-dimère composé de 2 sous-unités, TFIIE α de 56 kDa et TFIIE β de 34 kDa (Ohkuma et al., 1990). Il entre dans la formation du PIC après la formation de l'ARN Pol II en interagissant directement avec la forme non phosphorylée de l'ARN pol II, TFIIB et TFIIF (Orphanides et al., 1996). TFIIE recrute ensuite TFIIH sur le promoteur et régule ses activités kinase et hélicase (Lu et al., 1992). TFIIE va se fixer entre les nucléotides -10 et +10 via sa sous-unité TFIIE β .
- **TFIIF** : est un hétéro-tétramère composé de la répétition de 2 sous-unités RP30 (26 kDa) et RP74 (58 kDa). RAP30 est capable d'interagir avec l'ARN pol II et l'ADN (Garrett et al., 1992; Sopta et al., 1989). RAP74 interagit avec la sous-unité de la pol II, Rpb9. Cette interaction facilite le recrutement de l'ARNpol II sur le complexe promoteur/TFIID/TFIIB (Flores et al., 1991) et sa fixation augmente la stabilité de l'ARN pol II pour ce complexe. TFIIF est aussi nécessaire pour le recrutement de TFIIE et TFIIH (Orphanides et al., 1996).
- **TFIIH** : est composé de 2 sous-complexes : le CAK composé de CDK7, la cyclin H et MAT1, et le cœur avec XPB, p62, p52, p44, p34 et p8. Les 2 sous complexes sont liés par XPD. Il permet l'ouverture de l'ADN et la phosphorylation du CTD de l'ARN pol II lors de l'initiation de la transcription. Mais il est aussi impliqué dans le processus de réparation comme vu précédemment dans cette introduction.

Séquence régulatrice		Position	Consensus	Binding Factor
BRE	BRE ^{up}	-38 à -32	(G/C)(G/C)G(A/G)CGCC	TFIIB
	BRE ^{dw}	-23 à -17		
Boite TATA		-33 à -28	TATA(A/T)A(A/T)(A/G)	TBP (TFIID)
Inr		-2 à +4	(C/T)(C/T)AN(T/A)(C/T)(C/T)	TAF1 et TAF2 (TFIID)
MTE		+18 à +27	C(G/C)A(A/G)C(G/C)(G/C)AAG(G/C)	TFIID
DPE		+28 à +33	(A/G)G(A/T)CGTG	TAF6 et TAF9 (TFIID)
DCE	SI	+6 à +11	Contient CTTC obligatoirement	TAF1 (TFIID)
	SII	+16 à +21	Contient CTGT obligatoirement	
	SIII	+30 à +34	Contient AGC obligatoirement	
XCPE1		-8 à +1	(G/A/T)(G/C)G(T/C)GG(G/A)A(G/C)(A/C)	inconnu

Tableau 2 Les éléments régulateurs de la transcription : tableau récapitulatif des éléments régulateur de la transcription

Comme indiqué dans la description de ces facteurs de transcription, il existe des séquences sur le génome, plus ou moins proches des gènes qui vont permettre de réguler le processus de transcription.

c) Le promoteur et les séquences régulatrices de l'ADN

Le promoteur est la région du gène où la machinerie de transcription s'assemble. On retrouve dans cette région le TSS (Transcription Start Site), l'endroit où la transcription s'initie. Deux types majeurs d'organisation du promoteur ont été décrits : concentré et dispersé (Carninci et al., 2006). Les promoteurs concentrés sont caractérisés par la présence d'un TSS, positionné sur un nucléotide spécifique. Les promoteurs dispersés, au contraire, ont plusieurs TSS faiblement exploitables sur des régions allant de 50 à 100 paires de base. En plus de ces 2 types de promoteurs, certains ont été décrits comme ayant un TSS principal entouré de plusieurs faibles.

Les promoteurs concentrés représentent seulement un tiers des gènes humains et s'étendent sur une quarantaine de nucléotides, en amont et en aval du site d'initiation de la transcription (+1). Leur analyse a permis de découvrir le CPE (Core Promoter Element), qui contient des séquences régulatrices (**Tableau 2, Figure 8**)

La boîte TATA

La boîte TATA est le premier motif du promoteur minimal à avoir été découvert (Lifton et al., 1978). C'est l'élément du promoteur le plus connu. Elle est composée de la séquence consensus TATA(A/T)A(A/T)(A/G) et est située au niveau de la position -33 ou -28 du site d'initiation de la transcription (Carninci et al., 2006). Elle est reconnue et liée par le facteur TBP (TATA binding protein), qui est une sous-unité du complexe TFIID (Burley and Roeder, 1996; Roeder, 1991). La boîte TATA est conservée dans l'évolution, des archées aux humains, et est aussi présente chez les plantes. Cependant, la boîte TATA n'est pas présente sur tous les promoteurs. En effet, on la retrouve sur seulement 10 à 15% des promoteurs (Carninci et al., 2006).

L'élément initiateur Inr

Le motif initiateur (Inr) est situé autour du site d'initiation de la transcription (+1) entre les nucléotides -6 et +11. On retrouve ce motif chez les mammifères, chez la drosophile et chez la levure (Struhl, 1987). Chez les mammifères, la séquence consensus est (C/T)(C/T)A(N(T/A)(C/T)(C/T) (Corden et al., 1980). Le A dans la séquence est considéré comme le nucléotide « +1 » du site d'initiation de la transcription. Cette séquence est suffisante

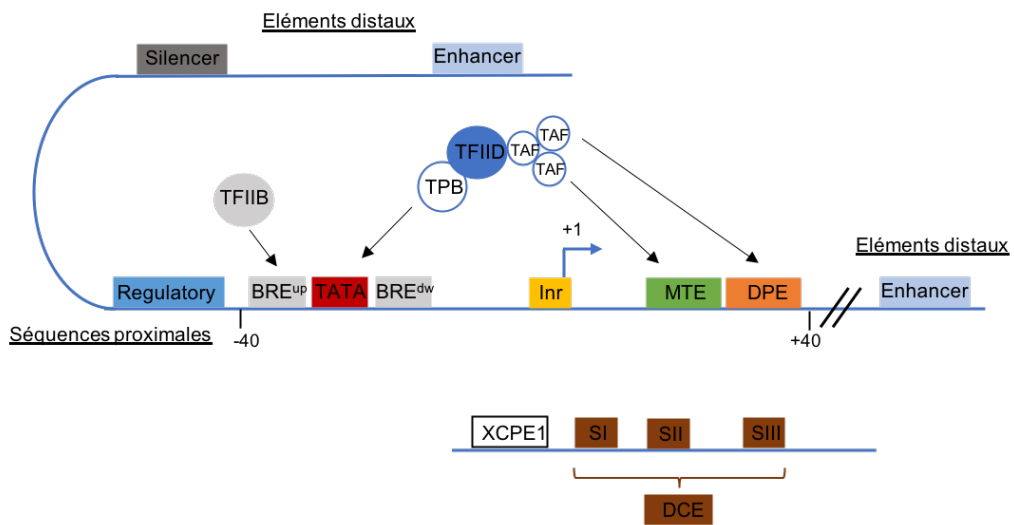


Figure 8 Organisation d'un promoteur : Organisation des différentes séquences régulatrices présentes au niveau des promoteurs (adaptée de (Juven-Gershon and Kadonaga, 2010)).

pour initier la transcription *in vivo* et *in vitro* indépendamment de la boîte TATA (Javahery et al., 1994). Les sous-unités TAF1 et TAF2 de TFIID (Chalkley and Verrijzer, 1999) ainsi que l'ARN pol II sont capables d'interagir avec la séquence (Aso et al., 1994).

Le « downstream promoter element » (DPE)

Le premier élément en aval du promoteur est le DPE (downstream promoter element). Sa séquence consensus est (A/G)G(A/T)CGTG. Le DPE est plus souvent retrouvé au niveau des promoteurs qui n'ont pas de boîte TATA, mais on peut quand même retrouver les deux éléments sur un même promoteur. Il est localisé précisément entre les nucléotides +28 et +32 par rapport au site d'initiation de transcription (Butler and Kadonaga, 2002; Kutach and Kadonaga, 2000). Cet élément est reconnu par les sous-unités TAF6 et TAF9 du facteur TFIID (Burke and Kadonaga, 1997).

Le « downstream core element » (DCE).

Le DCE est un élément alternatif à DPE, MTE observé pour la première fois dans le gène de la β -globine (Lewis et al., 2000). Cette séquence, contrairement aux autres, contient 3 sous-éléments discontinus : SI (CTTC), SII (CTGT) et SIII (AGC). Il est reconnu par TAF1 (TFIID) (Lee et al., 2005).

Le site de reconnaissance de TFIIB (BRE)

Le BRE (TFIIB recognition element) est le site de reconnaissance de TFIIB. Il est en fait divisé en deux éléments qui entourent la boîte TATA, BRE^{up} (BRE upstream) and BRE^{dw} (BRE downstream) (Deng and Roberts, 2005; Lagrange et al., 1998). Ils fonctionnent en coopération avec la boîte TATA en régulant le niveau de base de la transcription positivement mais aussi négativement (Deng et al., 2009; Evans et al., 2001). BRE^{up} est situé entre les nucléotides -38 et -32, alors que BRE^{dw} entre les nucléotides -23 et -17.

Le « Motif Ten Element » (MTE)

C'est un élément formé de la répétition d'un même motif, C(G/C)A(A/G)C(G/C)(G/C)AAG(G/C). Il est localisé juste avant le DPE, entre les nucléotides +18 à +27 (Ohler et al., 2002). Il interagit avec TFIID. Cet élément fonctionne avec l'Inr mais indépendamment du DPE et de la boîte TATA.

Le « X core promoter element 1 » (XCPE1)

XCPE1 est un élément rare englobant le TSS. Il est positionné entre les nucléotides -8 et +1 et sa séquence est (G/A/T)(G/C)G(T/C)GG(G/A)A(G/C)(A/C) (Tokusumi et al., 2007). Il est seulement présent dans 1% des promoteurs humains, le plus souvent ceux sans boîte TATA. Le facteur qui reconnaît cet élément n'a toujours pas été identifié.

Les éléments de régulation

Bien que toutes les cellules possèdent la même information génétique, le niveau d'expression des gènes n'est pas le même dans les différents types de cellules. Les gènes possèdent des séquences régulatrices qui vont permettre de contrôler le niveau de transcription. Il y en a de 2 types en fonction de leur éloignement par rapport au site d'initiation de la transcription.

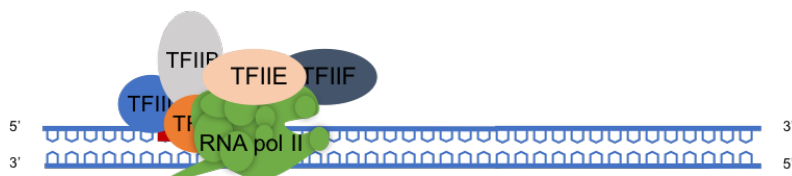
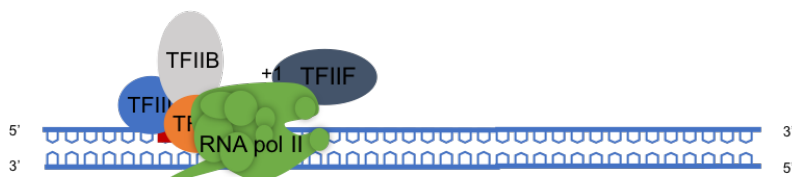
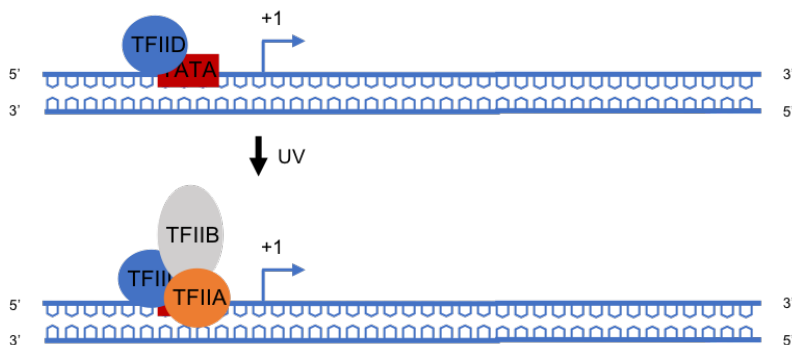
- **Les séquences proximales** situées entre 40 et 200 paires de bases en amont du site d'initiation. Elles peuvent avoir un effet activateur ou répresseur sur la transcription.
- **Les éléments dits distaux** sont eux situés à plusieurs milliers de paires de bases en amont ou en aval du site d'initiation (Ptashne and Gann, 1998). Ils sont appelés « enhancer » lorsqu'ils activent la transcription, « silencer » lorsqu'ils la répriment. L'ADN forme une boucle pour permettre le rapprochement de l'élément et du promoteur (Cook, 2003) et permettre de réguler la transcription.

a) La transcription

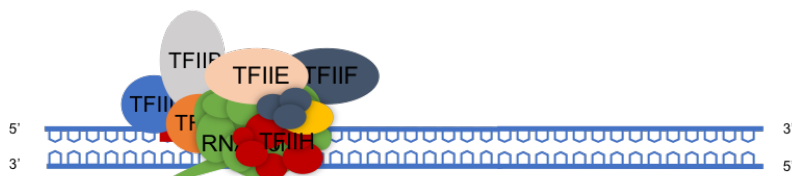
Le processus de transcription est divisé en trois grandes étapes : l'initiation qui consiste en la mise en place du complexe de transcription et la synthèse des premiers nucléotides suivi de l'élongation qui permet l'allongement de l'ARNm et la terminaison lorsque la machinerie de transcription se dissocie de l'ADN.

L'initiation commence par le recrutement séquentiel des différents facteurs généraux de transcription et par le recrutement de l'ARN pol II sur le promoteur du gène transcrit (**Figure 9**). C'est la formation du complexe de pré-initiation (PIC) (Buratowski et al., 1989). TFIID est le premier facteur à être recruté au niveau du promoteur. Sa sous-unité, TBP interagit avec la séquence régulatrice TATA. Cette interaction provoque une distorsion de l'ADN qui va faciliter le recrutement des autres facteurs. Les facteurs TFIIA et TFIIB arrivent ensuite. TFIIB va reconnaître deux autres séquences régulatrices des promoteurs, BRE^{up} et BRE^{dw}. TFIIA stabilise le complexe formé par TBP/TFIID/ADN (Kraemer et al., 2001). La structure formée par ce complexe est ensuite reconnue par l'ARN pol II qui arrive accompagnée de TFIIIF. TFIIIE arrive à son tour une fois le nouveau complexe stabilisé et va interagir avec l'ARN pol II non

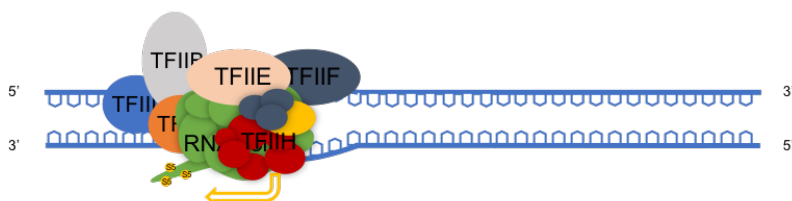
1. Recrutement séquentiel des facteurs généraux de transcription



2. Formation du complexe de pré-initiation (PIC)



3. Ouverture de l'ADN et phosphorylation du CTD de l'ARN pol II



4. Echappée du promoteur

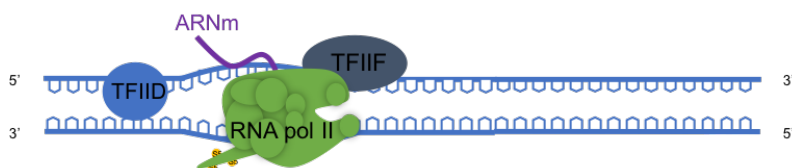


Figure 9 Schéma de l'initiation de la transcription *in vitro*

phosphorylée, TFIIB et TFIIF (Roeder, 1996). Enfin, TFIIH est recruté et permet de terminer la formation du PIC. Il a été montré que ce complexe peut se pré-assembler (sans TFIID) avant de venir se fixer sur le promoteur en une seule étape (Ossipow et al., 1995). Cependant la formation du PIC n'est pas suffisante pour démarrer la transcription. Il faut une ouverture de la double hélice de l'ADN suivie de l'échappée de l'ARN pol II du promoteur. C'est l'activité translocase de la protéine XPB de TFIIH qui va permettre l'ouverture de l'ADN au niveau du site d'initiation (-9, +2) (Alekseev et al., 2017). Cela forme alors le complexe ouvert de pré-initiation (POC) (Coin et al., 1999; Holstege et al., 1996). Lorsque l'ARNm est formé d'une dizaine de nucléotides, l'échappée du promoteur peut s'effectuer. Cette étape dépend cependant de la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase. Cette phosphorylation est réalisée par la sous-unité de TFIIH, CDK7. De plus, pour que l'ARN pol II s'échappe du promoteur, il faut qu'elle se désolidarise des autres facteurs de transcription. Seul TFIIF va suivre l'ARN pol II pendant l'élongation (Bengal et al., 1991). Les facteurs comme TBP ou TFIIE vont se détacher de l'ARN pol II lorsque celle-ci est phosphorylée (Maxon et al., 1994). TFIID, TFIIA, TFIIH et TFIIE vont rester au niveau du promoteur pour permettre une ré-initiation de la transcription dans un contexte *in vitro* (Yudkovsky et al., 2000).

L'élongation commence lorsque l'ARNm est constitué d'une dizaine de nucléotides. L'ADN à ce moment-là est ouvert sur une quinzaine de paire de base. La vitesse d'élongation varie selon de nombreux facteurs régulant positivement ou négativement l'élongation (Shilatifard et al., 2003). En effet, l'ARN pol II peut exister sous une forme active et inactive. Lorsqu'elle est inactive, c'est le phénomène de « pausing ». L'ARN pol II reste associée à l'ADN matrice jusqu'à ce que les conditions soient optimales pour poursuivre la transcription. Par exemple, le facteur FACT est une chaperonne d'histone qui va permettre de modifier l'environnement chromatinien pour favoriser le passage de l'ARN pol II.

Enfin, la terminaison va permettre le relargage de l'ARNm et la dissociation de l'ARN pol II. C'est l'étape la moins connue. Il semblerait qu'elle soit dépendante du processus de maturation des ARN en 3' qui est essentielle (Proudfoot, 1989) et la présence du signal de poly-adénylation (polyA) (Birse et al., 1998; Hirose and Manley, 2000). Le CTD de l'ARN pol II permet grâce à la phosphorylation de la sérine 2, le recrutement de facteur de maturation comme Pcf11 (Ahn et al., 2004). L'ARN est alors clivé au niveau du site polyA, le CTD est désphosphorylé par FCP1, ce qui permet le relargage de l'ARN (lian et al, 2008). L'ARN subit alors l'ajout de la queue polyA et l'épissage par le spliceosome pour pouvoir être traduit en protéine.

B) La régulation de l'environnement chromatinien

Pour que la transcription puisse se faire, il faut que l'environnement chromatinien soit modifié. En effet, la structure de la chromatine peut être un obstacle pour l'ARN pol II et les autres facteurs de la transcription car elle limite l'accessibilité de l'ADN.

a) L'organisation de la chromatine

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est organisé en une structure complexe en étant associé à des protéines spécifiques, la chromatine. L'ADN mesurant environ 2 mètres dans chaque cellule, il doit donc être « organisé » pour pouvoir rentrer dans le noyau cellulaire faisant quelques micromètres de diamètres (Kornberg, 1977). C'est donc en s'associant avec des protéines spécifiques, les histones, que l'ADN forme la chromatine et va pouvoir se compacter. Les histones sont des petite protéines basiques allant de 11 à 22kDa. Elles sont très conservées au cours de l'évolution. Elles sont formées d'un domaine globulaire hydrophobe chargé positivement et sont composées à 20% d'acides aminés chargés positivement (Arginine et Lysine).

L'unité élémentaire de la chromatine est le nucléosome (**Figure 10**). Il est composé d'un octamère d'histones entouré de 147 paires de bases. L'octamère d'histone est composé de 4 paires d'histones canoniques : H2A, H2B, H3 et H4 (Luger et al., 1997). L'assemblage de l'octamère d'histones commence par un l'hétéro-dimérisation de H3 et H4, puis la formation d'un tétramère $(H3-H4)_2$, s'ajoutent deux dimères H2A-H2B pour finir l'octamère (Arents and Moudrianakis, 1995).

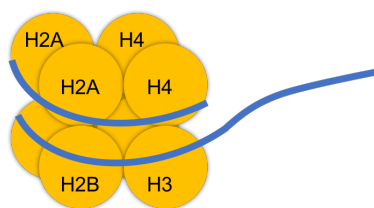


Figure 10 Schéma d'un nucléosome : Le nucléosome est composé de 4 paires d'histones H2A, H2B, H3 et H4. Ce cœur est entouré d'environ 147 paires de bases d'ADN

L'enroulement de l'ADN autour de plusieurs nucléosomes permet de former une structure appelée « collier de perle » de 11nm de diamètre (**Figure 11**). C'est le premier degré de compaction de l'ADN. La partie de l'ADN entre les nucléosomes, appelée partie inter-nucléosomique, peut supporter une cinquième histone appelée H1. H1 est très riche en acides aminés basiques (lysine) et va permettre de rapprocher et de maintenir les nucléosomes entre eux pour former le deuxième degré de compaction de l'ADN, la fibre de 30nm (Thoma et al.,

1979). La chromatine va ensuite former des boucles jusqu'à former la structure tertiaire d'environ 300nm de diamètre et enfin le nucléosome métaphasique de 1400nm.

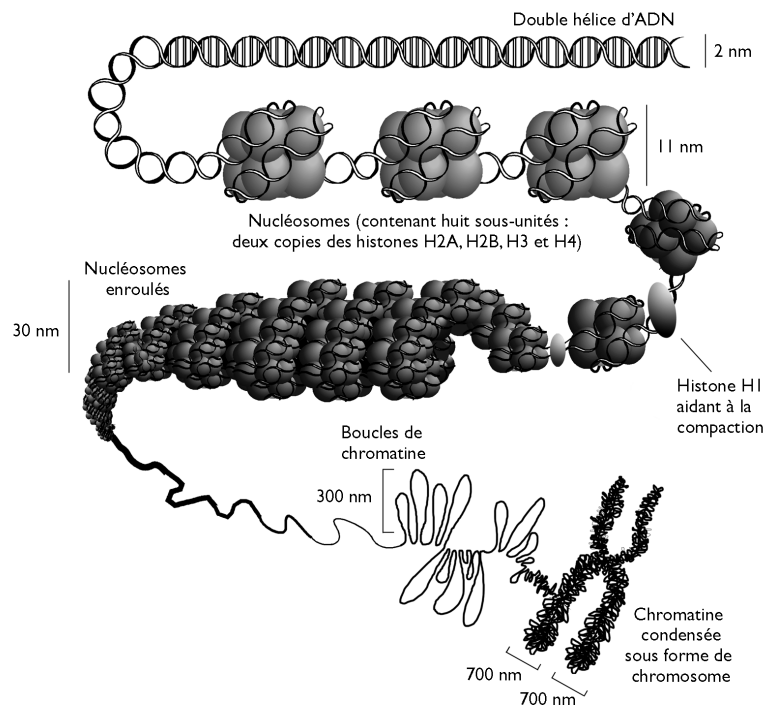


Figure 11 Schéma des différents niveaux de condensation de la chromatine : (Legastelois et al., 2017)

Le niveau de compaction de la chromatine peut varier dans le temps. En effet, lors de la transcription il existe une corrélation très importante entre le niveau de compaction de la chromatine et l'accessibilité aux gènes pour les facteurs de transcription. Les travaux d'Emil Heitz dans les années 1930 ont permis de mettre en évidence deux états de compaction. L'euchromatine est l'état décondensé, qui permet l'accès à l'ADN et aux différents facteurs de la machinerie de transcription d'avoir accès à l'ADN. L'hétérochromatine est au contraire l'état condensé empêchant la machinerie de transcription d'avoir accès à l'ADN. Il existe 2 types d'hétérochromatine, la première dite « constitutive » qui correspond à la partie silencieuse du génome comme les centromères et les télomères. La deuxième est la forme « facultative », on la retrouve au niveau des régions transcrites. Les changements de conformation sont régulés dans le noyau cellulaire par différentes variables comme les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation de l'ADN, les variations de la composition du nucléosome en remplaçant les histones canoniques par des variants d'histones.

b) Les variants d'histones

Les variants d'histones sont un premier moyen de jouer sur l'état de condensation de la chromatine. En plus des 4 histones majeurs présents dans le nucléosome, il existe des variants encodés par des gènes différents, présents à un niveau plus faible. Pour chaque histone majeure, excepté H4, il existe plusieurs isoformes (Trojer and Reinberg, 2007).

L'histone canonique H2A possède 8 variants : H2A.X, H2A.Z.Z, H2A.Z.2.1, H2A.Z.2.2, H2A.Bbd (connu aussi sous le nom de H2A.B), macroH2A1.1, macroH2A1.2 et macroH2A2.

Six variants de l'histone H3 ont été identifiés dans les cellules somatiques: H3.3, CENP-A (H3-like centromeric protein A), H3.1T, H3.5, H3.X (connu aussi comme H3.Y.2) et H3.Y. Pour l'histone H2B, 2 variants spécifiques au testis ont été identifiés : H2BFWT (H2B type WT, aussi connu sous le nom de H2B.W) et TSH2B (aussi connu sous le nom de H2B type 1A). Des variants de l'histone canonique H4 ont été découverts chez les trypanosomes (Hayashi et al., 1984; Siegel et al., 2009) mais aucuns chez les organismes multicellulaires.

Ces variants jouent un rôle dans la dynamique chromatinienne et sont impliqués dans de nombreux processus tels que la réparation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes, l'initiation et la terminaison de la transcription (Pusarla and Bhargava, 2005). Les histones majeurs sont synthétisés lors de la phase S du cycle cellulaire et sont dépendants de la réplication tandis que les variants d'histones peuvent être produits tout au long du cycle cellulaire. Comme les histones majeurs, les variants sont très conservés dans l'évolution. Il existe deux classifications différentes pour les variants d'histones :

- La première est basée sur la structure. Elle distingue les variants homéomorphes (qui diffèrent de leurs homologues conventionnels par quelques substitutions d'acides aminés ne modifiant pas la mobilité électrophorétique) des variants hétéromorphes (qui peuvent présenter des extrémités et une séquence variable au point d'en modifier la mobilité électrophorétique) (Franklin and Zweidler, 1977; West and Bonner, 1980).
- La seconde classification est basée sur des caractéristiques fonctionnelles telles que la dépendance ou l'indépendance par rapport à la réplication ou l'expression spécifique dans certains tissus.

Les variants d'histones peuvent donc prendre la place des histones canoniques dans les nucléosomes en fonction des processus cellulaires en cours. Ces échanges sont réalisés par des complexes de remodelage ATP dépendants (Narlikar et al., 2013). De plus, de par leurs caractères basiques et hydrophobes, les histones peuvent interagir aspécifiquement avec des molécules chargées négativement *in vivo*. Ce sont des protéines chaperonnes qui vont se lier aux histones pour les protéger et les séquestrer. Cette interaction se fait depuis leur synthèse

dans le cytoplasme jusqu'à leur incorporation dans les nucléosomes (Avvakumov et al., 2011) (**Tableau 3**). En plus des facteurs modifiant les histones, des machineries ont été mises en place par la cellule afin de déplacer le nucléosome de quelques centaines de paire de base, soit de la dissocier (Narlikar et al., 2013)

Lors de ma thèse, j'ai travaillé sur le variant d'histone H2A.Z

- Le variant H2A.Z

H2A.Z est fortement conservé durant l'évolution et est retrouvé dans différents organismes comme *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant il possède seulement 60% d'homologie avec l'histone canonique H2A ce qui suppose une fonction et un rôle différents (Jackson and Gorovsky, 2000; Thatcher and Gorovsky, 1994). H2A.Z remplace H2A au niveau des promoteurs. Son expression est essentielle pour la viabilité de plusieurs organismes comme *Tetrahymena thermophila* (Liu et al., 1996), *Drosophila melanogaster* (van Daal and Elgin, 1992). L'absence de H2A.Z chez *Xenopus* perturbe la gastrulation, ce qui engendre des malformations d'embryons. Aucune souris H2A.Z^{-/-} n'a été obtenues.

H2A.Z est connu pour être présent lors de nombreux processus biologiques comme la transcription, le maintien de la stabilité des chromosomes... Dans certains cas, une surexpression de H2A.Z a déjà été observée dans des tumeurs malignes, surtout dans les cas métastatiques (Dunican et al., 2002; Rhodes et al., 2004; Zucchi et al., 2004). Par exemple, dans les cancers du sein et de la prostate hormones dépendants, H2A.Z est surexprimé et contribue à l'activation des gènes régulés par les récepteurs nucléaires qui entraînent la prolifération (Zink and Hake, 2016). De plus la surexpression de H2A.Z dans les cancers du sein est corrélée avec un mauvais pronostic (Hua et al., 2008).

La structure globale du nucléosome contenant H2A.Z est similaire à celui avec H2A (Suto et al., 2000). La différence vient du domaine d'amarrage de H3-H4 (résidus 81 à 119 dans H2A). La substitution de l'acide glutamique en position 104 dans H2A par une glycine en position 106 dans H2A.Z résulte en une perte de 3 liaisons hydrogènes ce qui déstabilise l'interaction de H2A.Z avec H3 (Zlatanova and Thakar, 2008). De plus, l'histidine en position 112 à la surface d'un nucléosome contenant H2A.Z, se lie à un ion métallique, permettant la formation d'une surface pour l'interaction avec des protéines. Le dimère H2A.Z/H2B affiche une zone acide plus grande au niveau du nucléosome qui pourrait être importante pour interagir avec la queue N-terminale d'une histone H4 d'un nucléosome voisin ou bien avec d'autres facteurs protéiques (**Figure 12**). De plus, les nucléosomes isolés ont la faculté de glisser le long de l'ADN de façon spontanée en l'absence de complexe de remodelage de la chromatine

Histone canonique	Variants	Tissus (localisation dans le génome)	Chaperonne et complexe de remodelage	Fonctions
H2A	H2A.X	Tous (genome wide)	FACT (chaperonne)	Déposition et échange des histones
	H2A.Z.1	Tous (régions régulatrices, promoteurs, enhancers et hétérochromatine)	P400 (remodeleur)	Dépôt de H2A.Z
			SRCAP (remodeleur)	Dépôt de H2A.Z
			ANP32E (chaperonne)	Enlève H2A.Z au niveau des lésions de l'ADN
			INO80 (remodeleur)	Enlève H2A.Z ce qui permet la recombinaison par homologie
	H2A.Z.2.1	Tous (régions régulatrices, promoteurs, enhancers et hétérochromatine)	P400 (remodeleur)	Dépôt de H2A.Z
			SRCAP (remodeleur)	Dépôt de H2A.Z
	H2A.Z.2.2	Tous mais enrichi dans le cerveau	P400 (remodeleur)	Dépôt de H2A.Z
			SRCAP (remodeleur)	Dépôt de H2A.Z
	macroH2A1.1	Tous (hétérochromatine facultative et constitutive)	inconnu	inconnu
MacroH2A1.2	Tous (hétérochromatine facultative et constitutive)	ATRX (remodeleur)	Régulation négative	
MacroH2A2	Tous (hétérochromatine facultative et constitutive)	inconnu	inconnu	
H2A.Bbd	Testis et cerveau	NAP1 (chaperonne)	Assemblage et désassemblage des nucléosomes H2A.Bbd	
H2B	H2BFWT	Testis (inconnu)	SWI-SNF (remodeleur)	Remodelage et mobilisation des nucléosomes
	TH2B	Testis (inconnu)	inconnu	inconnu
H3	H3.3	Tous (éléments de régulation des gènes actifs et séquence hétérochromatique)	FACT (chaperonne)	Déposition et échange des histones
			NAP1 (chaperonne)	Importation dans le noyau et dépôt
			ASF1 (chaperonne)	Importation et transfert à HIRA
			NASP1 (chaperonne)	Protection de la dégradation
			DAXX-ATRX (chaperonne et remodeleur respectivement)	Dépôt dans l'hétérochromatine
			HIRA (chaperonne)	Dépôt au niveau des promoteurs
	CENP-A	Tous (centromère)	HJURP (chaperonne)	Dépôt au niveau des centromères
	H3.Y	Testis, cerveau, tumeur (euchromatine)	inconnu	Régulation des gènes du cycle cellulaire
	H3.X	Testis, cerveau, tumeur (euchromatine)	inconnu	inconnu
	H3.1t	Testis (inconnu)	inconnu	inconnu
H3.5	Testis (euchromatine)	inconnu	inconnu	

Tableau 3 Variants d'histones, leurs localisations et leurs régulations par les chaperonnes et les complexes de remodelage de la chromatine : adaptée de (Buschbeck and Hake, 2017)

(Beard, 1978; Meersseman et al., 1992). L'incorporation de H2A.Z dans ces nucléosomes permettrait d'augmenter cette mobilité (Flaus et al., 2004).

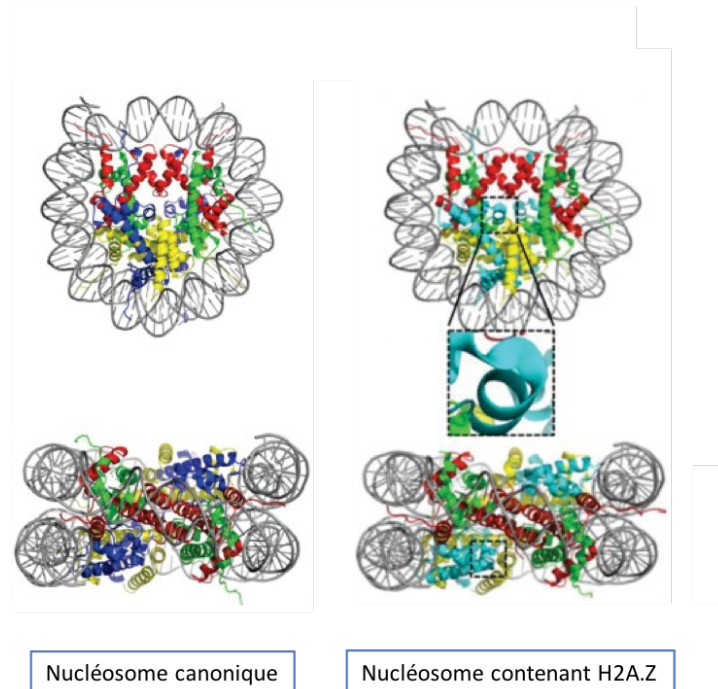


Figure 12 Structure d'un nucléosome canonique et d'un nucléosome avec H2A.Z : H2A.Z est en cyan à droite. Pour chacune des images, le nucléosome est montré de haut et de côté. La zone acide est délimitée par le carré. (adaptée de (Melters et al., 2015))

c) Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles des histones sont une autre source majeure de la variation de condensation de la chromatine (Fischle et al., 2003; Iizuka and Smith, 2003; Khorasanizadeh, 2004). En effet, elles peuvent subir de nombreuses modifications au niveau de l'extrémité N-terminale essentiellement mais aussi au niveau C-terminale. Ces modifications sont covalentes. Elles altèrent les charges électrostatiques des histones et changent leurs propriétés structurales et/ou modifient les interactions de leurs extrémités. On dénombre plusieurs types de modifications : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, l'ADP-ribosylation, la biotinylation, la déimination, la glycosylation (**Tableau 4**), les 3 premières étant les plus étudiées.

Modifications	Résidus modifiés	Enzymes
Acétylation	K-ac	Histone acétyltransférase Histone déacétylase
Méthylation	K-me1/me2 R-me1/me2/me3	Méthyltransférase Déméthylase
Phosphorylation	S-p T-p	Kinase Phosphatase
Ubiquitination	K-ub	Complexe E1, E2, E3 Isopeptidase
Sumoylation	K-su	Complexe E1, E2, E3 Isopeptidase
ADP-ribosylation	K-ar S-ar G-ar	Mono ou poly ADP ribosyltransférase Sirtuines Glycohydrolase
Biotinylation	K-b	Holocarboxylase Biotinidase
Déimination	R	Peptidylarginine déiminase 4

Tableau 4 Liste des différentes modifications post-traductionnelles connues des histones

Ces modifications vont donc modifier la chromatine de deux façons différentes :

- Une action directe sur la structure du nucléosome.

L'acétylation ou la phosphorylation des histones réduisant la charge positive des histones menant à une perturbation des interactions entre les nucléosomes, les histones elles-mêmes et avec l'ADN. Il y a de nombreux sites d'acétylation : H3K9, H3K14, H3K18, H4K5, H4K8, H4K12... L'hyper-acétylation des histones va permettre d'obtenir l'euchromatine (Kouzarides, 2007; Wang et al., 2008).

- La régulation des protéines interagissant avec la chromatine

De nombreux facteurs sont associés à la chromatine en interagissant spécifiquement avec les histones via différents domaines.

Ainsi, l'euchromatine est enrichie en histones acétylés comme H3K9ac et H4K16ac mais présente aussi la méthylation de l'histone H3K4 (H3K4me) (Grunstein et al., 1995; Litt et al., 2001; Noma K et al., 2001). Au contraire, l'hétérochromatine se caractérise par une hypo-acétylation des histones, une méthylation d'histones bien précise comme H3K9me, H3K7me (Jenuwein and Allis, 2001; Rea et al., 2000; Tschiersch et al., 1994) et la méthylation de l'ADN

(Keshet et al., 1986). Il existe plus de 60 résidus susceptibles d'être modifiés (Kouzarides, 2007) (**Figure 13**).

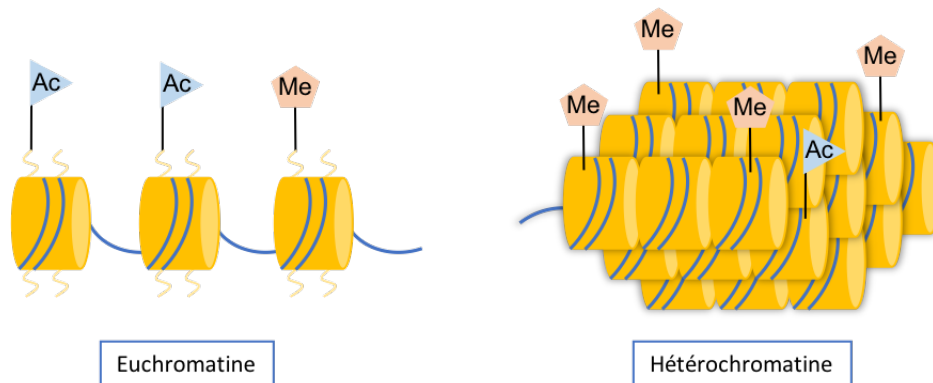


Figure 13 Schéma des modifications post-traductionnelles des histones dans le nucléosome

L'acétylation :

Les histones acétyl-transférases (HATs) sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupement acétyle à partir d'un acétyl-CoA vers le groupement amino-terminal des résidus lysines de la queue N-terminale des histones. Les histones déacétylases (HDAC) enlèvent ce résidu acétyle (**Figure 14**).

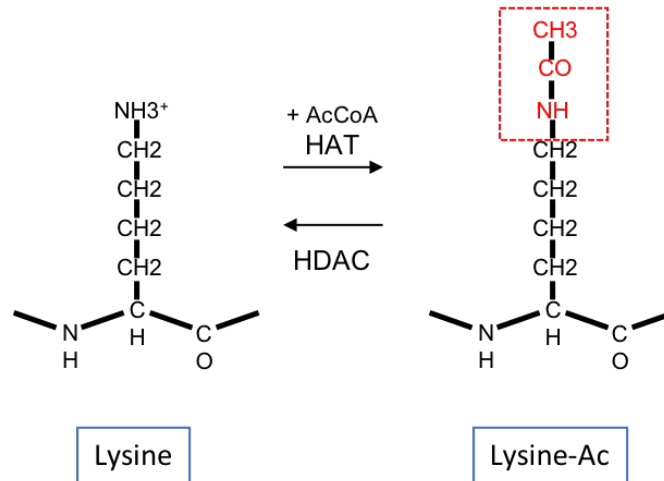


Figure 14 Schéma de l'acétylation d'une lysine

Il existe plusieurs classes de HAT, les GNAT (GCN5 related N-acetyl) comprenant les acétyl-transférases GCN5, PCAF ou HAT1 (Dyda et al., 2000), les MYST (Utlely and Côté, 2003), et enfin CBP/p300 (**Tableau 5**) (Bannister and Kouzarides, 1996). Ces différentes HATs sont retrouvées au sein de complexes multi-protéiques, recrutés au niveau de la chromatine, leur permettant d'interagir avec des facteurs de transcription et pouvant, dans certains cas modifier leurs spécificités. En effet, les régions transcriptionnellement actives sont riches en histones

Familles HAT	Enzyme HAT	Organismes connus	Complexe	Spécificité	Fonctions
GNAT	Gcn5	Levure à l'Homme	ADA2, ATAC, SAGA	H3, H2B	Co-activateur
	PCAF	Homme, souris	PCAF	H3, H4	Co-activateur
	Hat1	Levure	HatB	H4 (K5, K12) H2B	Dépôt d'histones, répression
	Elp3	Levure à l'Homme	Elongateur	H3, H4	Élongation transcriptionnelle
	Hpa2	Levure		H3, H4	Inconnue
	ATF-2	Homme, souris		H2B, H4	Facteur de transcription séquence spécifique
MYST	Sas2	Levure		H4 (K16)	Répression
	Sas3	Levure	NuA3	H3, H4, H2A	Répression
	MORF	Homme		H4 > H3	Inconnue
	TIP60	Homme	TIP60	H4 >> H3, H2A	Interaction avec Tat du VIH, réparation de l'ADN, apoptose
	Esa1	Homme	NuA4	H4 (K16)	Progression du cycle cellulaire
	MOF	Drosophile	MSL	H3, H4	Compensation de dosage
	HBO1	Homme	HBO1	H3, H4 > H2A	Réplication de l'ADN
MOZ	Homme	AML1		Activation de transcription	
P300/CBP	P300	Organismes multicellulaires		H2A, H2B, H3, H4	Co-activateur
	CBP	Organismes multicellulaires		H2A, H2B, H3, H4	Co-activateur
Co-activateurs des récepteurs aux hormones	ACTR	Homme, souris		H3 > H4	Co-activateurs de récepteurs d'hormones
	SRC-1	Homme, souris		H3 > H4	Co-activateurs de récepteurs d'hormones
	TIF2	Homme, souris			Co-activateurs de récepteurs d'hormones
TAFII250	TAFII250	Levure à l'Homme	TFIID	H3 > H4, H2A	Facteur associé à TBP, progression du cycle cellulaire
TFIIIC	TFIIIC220	Homme	TFIIIC	H3, H4 > H2A	Transcription par l'ARN pol III
	TFIIIC110	Homme			
	TFIIIC90	Homme			
Nut1	Nut1 (in vitro)	Homme	Méiateur	H3 >> H4	Transcription par l'ARN pol II

Tableau 5 Les différentes classes de HAT : (adapté de (Vaquero et al., 2003))

acétylés, alors que les histones dans l'hétérochromatine sont hypo-acétylés (Spotswood and Turner, 2002). La première HAT identifiée et clairement liée à l'acétylation des histones est GCN5 aussi connue sous le nom de KAT2A (Lysine AcetylTransferase 2A) (Brownell et al., 1996). KAT2A permet l'acétylation de H3K14. Elle fait partie de deux différents complexes SAGA et ATAC qui stimulent son activité kinase (Grant et al., 1997). Au sein de ces complexes, KAT2A est capable d'acétyler H3K9 et H3K14 mais à différentes positions sur le génome. ATAC contenant KAT2A cible les enhanceurs (Krebs et al., 2011; Nagy et al., 2010). KAT2A présent dans le complexe SAGA acétyle aussi H3K18 et H3K23 (Rodríguez-Navarro, 2009). KAT2A (ou son paralogue, PCAF aussi nommé KAT5) et CBP/p300 sont recrutés au niveau des promoteurs des gènes ciblés par les récepteurs nucléaires et responsable de l'acétylation de H3K9 et H2K18/27 respectivement (Jin et al., 2011). Le facteur de Transcription E2F1 s'associe avec KAT2A pour l'acétylation de H3K9 lors de la NER (Guo et al., 2011b).

Les variants d'histones peuvent aussi être acétylés. En effet, il existe 5 sites d'acétylation sur l'H2A.Z humain (K4, K7, K11, K13, et K15) (Dryhurst et al., 2004). Cependant les HATs responsable ne sont pas clairement identifiées. Chez la levure, les HATs responsables de cette acétylation sont KAT2A et ESA1 (Keogh et al., 2006; Mehta et al., 2010; Millar et al., 2006). L'orthologue de ESA1 chez les mammifères est TIP60 (KAT5), une sous-unité du complexe NuA4 (Doyon and Côté, 2004).

Les HDACs jouent un rôle important dans la répression transcriptionnelle. De la même façon que pour les HATs, il existe plusieurs classes de HDACs selon leurs profils d'expressions, leurs homologies et leur sensibilité aux inhibiteurs (**Tableau 6**). Les HDACs ont besoin du co-facteur NAD⁺ pour avoir leur activité de déacétylation.

Les HDACs appartiennent souvent à des complexes multi-protéiques. Certains répresseurs transcriptionnels sont associés à des HDACs. Cette activité est nécessaire pour réprimer certains gènes (Peterson, 2002; Vaquero et al., 2003). Leur dérégulation est impliquée dans la carcinogénèse, avec souvent une surexpression (Minucci and Pelicci, 2006), c'est pourquoi de nombreux inhibiteurs de HDACs sont utilisés pour leurs potentiels anti-cancéreux (Gallinari et al., 2007).

Groupe HDAC	Membres du groupe	Dépendance NAD ⁺	Localisation	Fonction
Classe I (homologue de Rdp3 chez la levure)	HDAC1/2/3/8	Non	Nucléaire et ubiquitaire	Implication dans de nombreuses fonctions comme la répression transcriptionnelle et la différenciation cellulaire
Classe II (Homologue de Hda1 chez la levure)	HDAC4/5/6/7/9/10	Non	Expression spécifique selon les tissus	Répression transcriptionnelle, régulation des microtubules
Classe III (Sir2 levure)	Sir2, HST1-4	Oui	Nucléaire, cytoplasmique ou mitochondrial	Implication dans la répression, lien avec le vieillissement. Fonctions dans le développement et la réparation de l'ADN.

Tableau 6 Les différents groupes d'histones déacétylases (HDACs) : adapté de (Vaquero et al., 2003)

Ces complexes HATs et HDACs peuvent être recrutés par des facteurs de transcription pour agir comme des co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription. Ils seraient ciblés sur des promoteurs spécifiques. Une fois recrutés sur la chromatine, ces complexes modifient spécifiquement les histones entraînant soit l'activation soit la répression. L'acétylation des histones joue aussi un rôle dans plusieurs processus nucléaires comme l'assemblage de la chromatine, la réparation de l'ADN, l'apoptose... (Iizuka and Smith, 2003). Certaines HATs peuvent aussi acétyler des protéines autres que les histones, et alors influencer leurs fonctions (Gu and Roeder, 1997; Pelletier et al., 2000).

La famille des BETs (bromodomains and extra terminal). chez les mammifères sont au nombre de 4, BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT. Elles possèdent 2 domaines Bromodomaines au niveau N-terminal, dont la séquence est fortement conservée entre les différents membres, leur permettant d'interagir avec les lysines acétylées et leur conférant un rôle de « readers ». Les BRDs peuvent contribuer à une acétylation des histones hautement spécifique en rattachant des HAT transcriptionnels à des sites chromosomiques spécifiques ou à l'activité de complexes multi-protéiques dans le remodelage de la chromatine (Barbieri et al., 2013). BRD2 se lie à des groupes ε-aminoacétyle de lysines d'histone nucléosomale, indépendamment de PTEFb, et fournit une plateforme de recrutement sur la chromatine pour des protéines E2Fs, des HDACs, des HATs spécifiques de H4 et des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, couplant ainsi l'acétylation des histones à la transcription (Houzelstein et al., 2002).

La méthylation :

La méthylation des histones se produit à différents niveaux sur les résidus lysine et arginine. Les histones méthyl-transférases (HMTs) catalysent le transfert de groupements méthyles à partir d'une méthionine S-adénosyl (SAM) vers un groupement ϵ amio-terminal d'un résidu lysine ou arginine (**Figure 15**). In vivo, les lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées alors que les arginines n'existent que sous les formes mono- et di-méthylées.

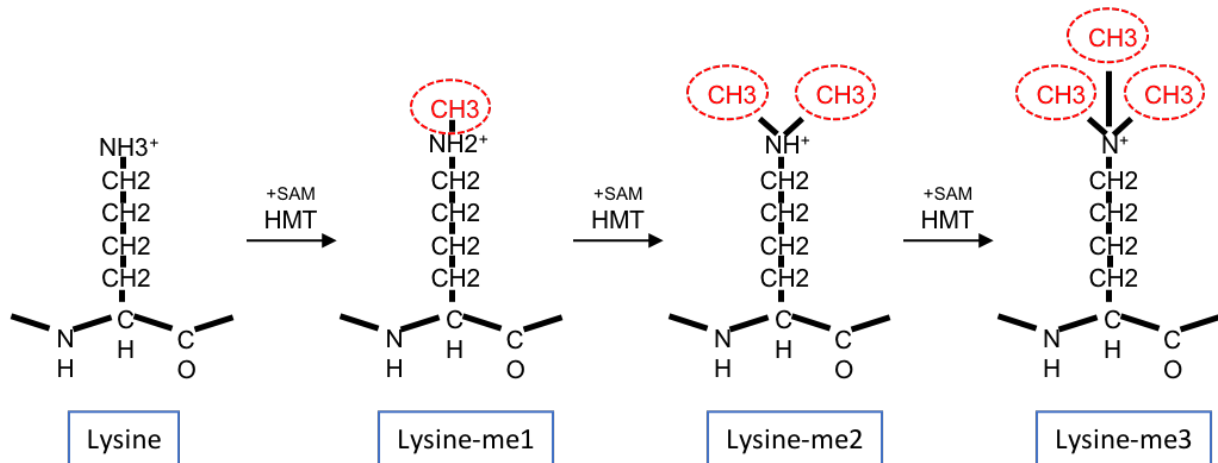


Figure 15 Schéma de la méthylation d'une lysine :

Contrairement à l'acétylation, la méthylation n'est pas une modification uniquement activatrice ou répressive pour la transcription. Cela varie en fonction du résidu méthylé. Elle n'altère pas la charge de l'histone et ne perturbe pas sa structure, elle permet principalement la constitution d'un site de recrutement de protéines régulatrices (Kouzarides, 2007). Le degré de méthylation varie en fonction des propriétés intrinsèques des enzymes. Par exemple, DIM5 triméthyle H3K9 (Tamaru et al., 2003) alors que SET7/9 monométhyle H3K4 (Xiao et al., 2003). Les formes méthylées de H3K9, -K27 et H4K20 sont essentiellement associées à l'hétérochromatine alors que la méthylation de H3K4, -K36 et K79 est associée à l'euchromatine. (Bannister and Kouzarides, 2011).

Il existe différents types d'HMTs, les PRMTs (protein arginine methyltransferase) qui sont les méthyltransférases des arginines et les PHMTs (protein lysine methyltransferase) qui catalysent les lysines (**Tableau 7**). Les PHMTs présentent toutes un domaine enzymatique SET en commun.

H2A.Z possède deux sites de méthylation, K4 et K7, qui sont aussi des sites d'acétylation (Binda, 2013). La mono-méthylation est faite par SET6 et SET7, et elle bloque l'acétylation de ces mêmes sites. Il semblerait donc que ces méthylations soient associées à une inhibition de la transcription (Sevilla and Binda, 2014).

Pendant longtemps la méthylation était considérée comme une modification stable et irréversible. Cependant, l'enzyme PADI4 (peptidyl-arginine deiminase 4) semble être capable de réaliser la déméthylation d'une arginine, en convertissant une méthyl-arginine en citrulline

Groupe HMT	HMT	Spécificité	Fonctions
Arginine	PRMT1	H4-R3 (protéines non histones)	Activation transcriptionnelle
	PRMT2	Inconnue	Co-activateur de récepteur oestrogène
	PRMT3	Inconnue	Cytoplasmique
	PRMT4/CARM1	H3-R2, -R17, -R26	Activateur transcriptionnel
	PRMT5	H2A, H4	Répresseur transcriptionnel
Lysine, Domaine SET	SUV39H1 SUV39H2	H3-K9	Formation de l'hétérochromatine, répression
	G9a	H3-K9, -K27	Rôle dans l'embryogenèse précoce, répression transcriptionnel
	ASH1	H3-K4, -K9, H4-K20	Établissement d'un profil actif en transcription
	Set1	H3-K4	Répression
	Set2	H3-K36	Répression, transcription
	Set7	H4-K20	Développement, répression de la chromatine, implication dans le vieillissement
	Set9	H3-K4	Activation transcriptionnelle
	ESC-E(Z)	H3-K27	Répression médiée par Polycomb
SETDB1	H3-K9	Répression médiée par le co-répresseur KAP-1	
Dot	Dot1	H3-K79	Répression

Tableau 7 Les différents groupes de HMT : adapté de (Vaquero et al., 2003)

(Cuthbert et al., 2004). Plus récemment, d'autres déméthylases des arginines ont été mises en évidence, comme JMJD6 qui déméthyle H3R2 et H3R3 (Chang et al., 2007). Pour la déméthylation des lysines, l'enzyme LSD1 (lysine specific demethylase 1) est capable d'utiliser le co-facteur FAD pour catalyser la déméthylation de H3K4 (Shi et al., 2004). Deux classes de déméthylases ont alors été décrites : celle présentant un domaine LSD1 et celle ayant un domaine catalytique JMJD (JMJC jumonji domain) dont fait partie JMJD2.

La phosphorylation

La phosphorylation est un phénomène dynamique réversible, impliqué lors de nombreux processus biologiques comme l'activation transcriptionnelle, l'apoptose, la réparation de l'ADN ou la condensation des chromosomes. Elle se réalise sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine; ce sont les kinases et les phosphatases qui régulent cette modification (**Figure 16**). Les kinases catalysent l'ajout d'un groupement phosphate de l'ATP au groupement hydroxyl

d'un acide aminé. Cet ajout se fait majoritairement au niveau de la queue N-terminale et ajoute des charges négatives aux histones influençant la structure chromatinienne. Néanmoins, récemment des études ont montré l'existence de phosphorylation au niveau de la région globulaire des histones, avec la phosphorylation de H3Y41 par la kinase JAK2 (Dawson et al., 2009).

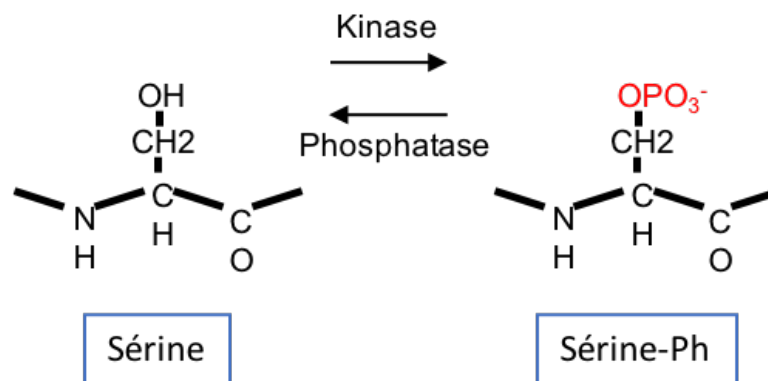


Figure 16 Schéma de la phosphorylation d'une sérine

La phosphorylation de H3S10 par la kinase Aurora B est impliquée dans la condensation de la chromatine (Clayton and Mahadevan, 2003). Cette phosphorylation est également observée lors de l'activation transcriptionnelle des gènes régulés par le facteur de transcription NF-KB. La phosphorylation de la sérine 139 de H2A.X est impliquée lors de la réparation des cassures double-brin. Elle permet l'ouverture de la chromatine sur quelques kilobases autour de la lésion (Sharma et al., 2012).

Chez l'Homme, huit phosphatases ont été décrites mais seulement 3 semblent jouer un rôle dans la déphosphorylation des histones : PP1, PP2A et PP4. Ce sont les deux dernières qui déphosphorylent H2A.X après la réparation de l'ADN (Nakada et al., 2008).

d) La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est retrouvée dans la plupart des organismes vivants, de la bactérie aux mammifères (Bird, 2002). C'est un processus majeur de la régulation de la transcription qui joue un rôle central dans les modifications de conformation de la chromatine. C'est une marque épigénétique, principalement liée à la répression de la transcription. Chez les vertébrés, cette modification ne touche que les cytosines suivies d'une guanine (CpG). Cette modification consiste en l'ajout d'un groupement méthyl au niveau du carbone 5' d'une cytosine d'un dinucléotide CpG (5 méthylcytosine, 5mC). Cette réaction est catalysée par les DNMTs (DNA methyltransferase), présentant un domaine catalytique en C-terminale. Il existe

3 types de DNMT : les DNMT1 dont le rôle principal est la maintenance d'un profil de méthylation en phase S lors de la réplication. Le rôle de DNMT2 est très peu connu chez les mammifères. DNMT3 existe sous 2 isoformes (DNMT3a/b) qui sont impliqués dans le processus de méthylation de l'ADN lors de l'embryogenèse (Okano et al., 1999).

Les îlots CpG sont de courtes régions où l'on retrouve une grande quantité de di-nucléotides CpG (Deaton and Bird, 2011). Ces îlots CpG font généralement 200 paires de bases, sont localisés au niveau des promoteurs et/ou du premier exon de plus de 70% des gènes (Saxonov et al., 2006). On dénombre environ 25 000 îlots CpG sur l'ensemble du génome (Illingworth and Bird, 2009). La méthylation sert principalement de plateforme de recrutement pour de nombreuses enzymes. Cette modification est reconnue par des MBP (methyl binding protein) tels que MeCP2, MBP2, MBP3. Elles se fixent au niveau des CpG méthylés et provoquent le recrutement d'enzymes de modifications d'histones telles que les HDACs (Nan et al., 1998), ou des HMTs (Fuks et al., 2003). Chez *Arabidopsis thaliana* la méthylation de l'ADN est accompagnée d'une déficience de l'histone variant H2A.Z dans ces zones (Zilberman et al., 2008).

Comme pour la méthylation des histones, ce n'est que récemment que le phénomène dynamique de la déméthylation a été accepté, avec la description d'une forme résultant du métabolisme du 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) (Kriaucionis and Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009). Cette réaction consiste en l'élimination du groupement méthyl présent en 5' des cytosines méthylées. Elle est catalysée par les TETs (ten eleven translocation). Les TET existent sous 3 isoformes : TET 1, 2 et 3 (Williams et al., 2011). TET1 et TET3 présentent un domaine CXXC qui est capable de se lier aux CpGs. Les 5mCs sont converties en 5hmC, que l'on retrouve à des niveaux variables dans les tissus. Cela laisse à penser que c'est un état transitoire de la déméthylation active. Deux voies ont été présentées pour passer de la forme 5hmC à une cytosine déméthylée (**Figure 17**). La première voie commencerait par une déamination réalisée par les AIDs (activation induced cytidine deaminase)/APOBEC, en convertissant les 5hmCs en 5hmUs (5-hydroxyméthyluracil). Cette étape est suivie d'une glycosylation par Mbd4 ou TDG (thymine DNA glycolase), générant un acide apyrimidique. Il sera remplacé par une cytosine par le mécanisme de réparation BER (Guo et al., 2011a). La seconde voie consiste en une oxydation successive du résidu 5hmC en 5fC (5-formylcytosine) puis en 5caC (5-carboxylcytosine) par les protéines TETs (He et al., 2011; Ito et al., 2011). Le passage de l'étape de 5caC à une cytosine déméthylée serait effectué par TDG. Récemment la protéine Gadd45 α , connue pour son rôle dans la réparation de l'ADN, interviendrait avec

des déaminases et les glycosylases lors de la conversion du 5hmU en cytosine déméthylée (Rai et al., 2008).

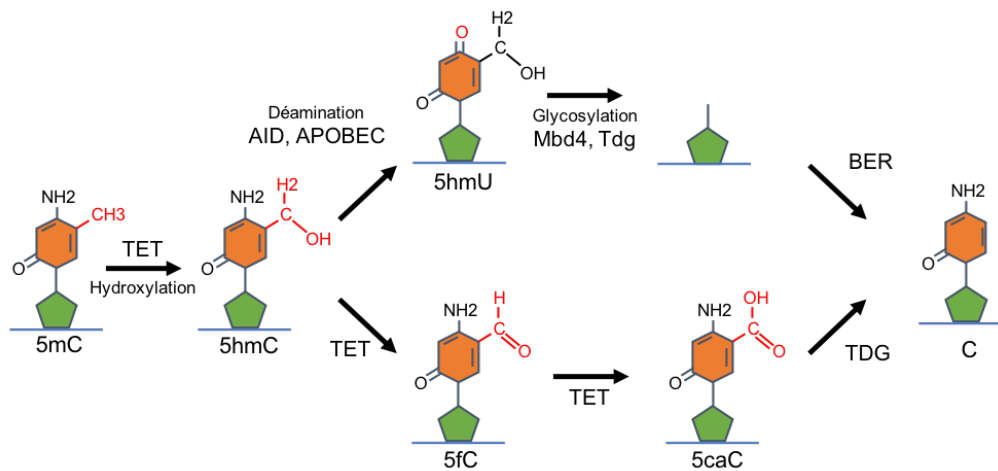


Figure 17 Mécanisme de déméthylation active d'une cytosine : adapté de (Cedar and Bergman, 2012)

C) La transcription des gènes régulés par le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR)

Au cours des recherches menées dans notre laboratoire, le modèle de l'acide rétinoïque a été utilisé. Me basant sur ces recherches, j'ai continué à utiliser ce modèle (Alekseev et al., 2017; Le May et al., 2010b, 2012b, 2012a; Singh et al., 2015).

a) Les récepteurs nucléaires

Dans nos cellules, certains gènes sont transcrits de manière permanente pour les processus basiques de maintenance de la fonction cellulaire. Ce sont les « gènes de ménages » (housekeeping gene) comme GAPDH, HSP90, 18S. On retrouve aussi beaucoup de gènes régulés par l'action de stimulus endogènes ou exogènes. Par exemple, les hormones sont un stimuli endogène. Elles vont interagir avec les récepteurs nucléaires et permettre de réguler de manière précise l'expression de certains gènes.

Les récepteurs nucléaires sont une super famille de facteurs de transcription qui régulent de grandes fonctions biologiques comme la croissance, la reproduction... Les récepteurs nucléaires possèdent une structure constituée de différents domaines fonctionnels. Il y a un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine de liaison au ligand (LDB) (Alekseev et al., 2017; Le May et al., 2010b, 2012a, 2012b; Singh et al., 2015). On retrouve en N-terminale un domaine qui n'est que peu conservé entre les différents récepteurs nucléaires, le NTD. Les récepteurs sont classés en fonction de la nature de leurs ligands et de leurs modes de fixation à l'ADN (Miesfeld et al., 1984). Il existe 3 classes :

- **La classe I** : contient les récepteurs aux hormones stéroïdiennes se fixant sur l'ADN sous forme d'homo-dimère. On y retrouve les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR).
- **La classe II** : contient les récepteurs qui se lient à l'ADN en formant un hétéro-dimère avec RXR (récepteur X à l'acide rétinoïque). Ce sont les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (RT), à l'acide rétinoïque (RAR) et à la vitamine D (VDR).
- **La classe III** : qui contient les récepteurs capables de se lier sous forme d'homo-dimère avec l'ADN. On y retrouve le récepteur X à l'acide rétinoïque (RXR α), et des récepteurs orphelins (Kastner et al., 1995).

b) Le récepteur à l'acide rétinoïque

Le récepteur à l'acide rétinoïque est activé par les rétinoïdes, des dérivés de la vitamine A. La vitamine A est essentielle pour le développement embryonnaire, l'homéostasie cellulaire... La seule source de vitamine A provient de l'alimentation. La vitamine A va donner naissance à l'acide rétinoïque qui interagit avec les protéines cytosoliques (CRABP-1 et CRABP-2) afin d'entrer dans le noyau cellulaire (Mangelsdorf et al., 1995). Il va agir sur l'expression des gènes en activant le récepteur nucléaire RAR. RAR existe sous trois isoformes α (NR1B1), β (NR1B2) et γ (NR1B3) (Budhu and Noy, 2002; Delva et al., 1999). Ces isoformes diffèrent par leur extrémité N-terminale (Chambon, 1996).

Le récepteur à l'acide rétinoïque a une organisation bien définie. Sa structure est composée de 3 domaines majeurs : un domaine central de liaison à l'ADN (DBD), un domaine de liaison au ligand (LBD) en C-terminale et un domaine N-terminale (NTD) (**Figure 18**) (Germain et al., 2006).

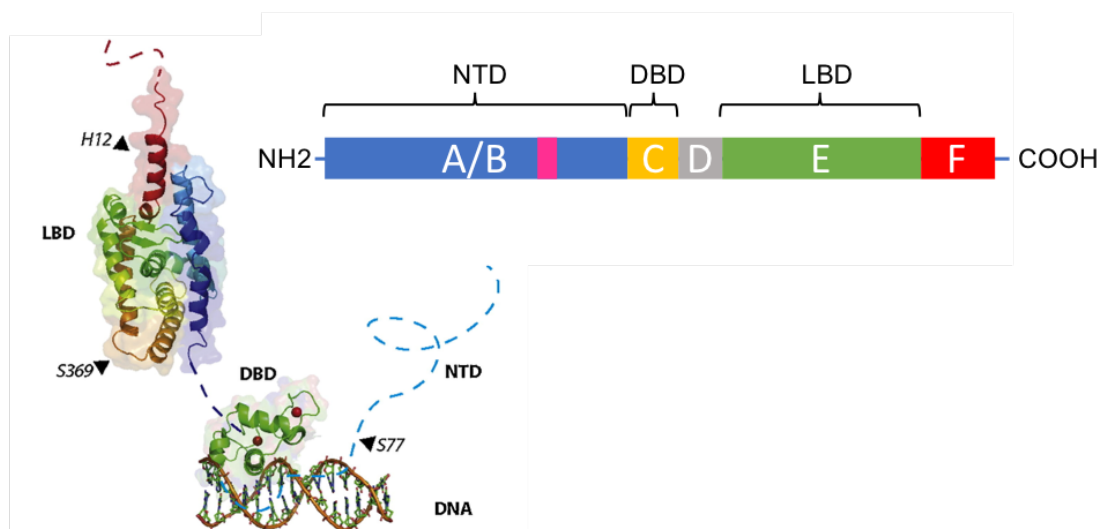


Figure 18 Schéma du récepteur à l'acide rétinoïque :

Le DBD est le domaine le plus conservé. Il s'agit d'un domaine globulaire, formé de deux motifs en doigt de zinc reliés par une boucle, suivi d'une extension COOH-terminale (Zechel et al., 1994a, 1994b). Ces motifs forment deux hélices α perpendiculaires, dont la première s'insère dans le grand sillon de l'ADN et la seconde maintient la stabilité du domaine (Lee et al., 1993). Le domaine DBD permet aux RARs de se lier à de courtes séquences d'ADN nommées RARE (retinoic acid response element), localisées dans les promoteurs des gènes cibles de l'Acide rétinoïque. La reconnaissance des RAREs nécessite cependant la formation de l'hétéro-dimère RAR/RXR. Ces éléments de réponse sont formés par la répétition d'un motif hexamère (A/G) G (G/T) TCA (Zechel et al., 1994a, 1994b).

L'extension COOH-terminale du domaine DBD semble permettre la reconnaissance à l'ADN et/ou la dimérisation via un changement de conformation (Leid et al., 1992; Mangelsdorf and Evans, 1995). Ce domaine subit aussi énormément de modifications post-traductionnelles tels que des phosphorylations pouvant moduler son interaction avec l'ADN (Khorasanizadeh and Rastinejad, 2001).

Le **LDB** est le domaine situé en C-terminale. C'est le domaine majeur de la reconnaissance du ligand, très conservé dans les différents RARs. Il est composé de 12 hélices α qui forment un enchevêtrement de trois feuillets d'hélices antiparallèles (Renaud and Moras, 2000). Il contient une poche de liaison au ligand (LBP), une surface de dimérisation avec le LDB du récepteur RXR et une surface de liaison pour des co-régulateurs. L'analyse par cristallographie a mis en évidence l'importance de l'hélice H12, qui renferme la fonction de transactivation dépendante du ligand appelée AF-2 (le Maire et al., 2010).

Le **NTD** (NH2 terminal domain) est le troisième domaine du RAR. Il inclut la fonction de transactivation indépendante du ligand AF-1 (Nagpal et al., 1993). En effet, le NTD est capable à lui seul d'activer la transactivation de gène cible, même en absence de ligand. Cependant, cette fonction est très minoritaire comparée à celle du LDB.

c) La transcription des gènes ciblés par le récepteur à l'Acide rétinoïque

L'activation des gènes cibles de l'Acide Rétinoïque est séquentielle. Elle permet de passer d'un état de répression à un état d'activation des gènes. Ce mécanisme est basé sur les changements conformationnels de l'hélice H12 de RAR et sur le recrutement de complexes multi-protéiques par le LBD (Dilworth and Chambon, 2001).

En absence de ligand, l'hétéro-dimère RAR/RXR se lie à l'ADN au niveau des éléments RAREs. Il est associé à un complexe co-répresseur, via l'hélice H12 du LBD de RAR réprimant ainsi l'expression du gène cible. Certains co-répresseurs comme SMRT (silencing mediator of

retinoic and thyroid receptor) et NCoR (nuclear receptor corepressor) n'ayant pas d'action enzymatique propre, servent de plateforme pour le recrutement de HDAC I, II ou III. Ces déacétylases maintiennent au niveau du promoteur, un état chromatinien non favorable à la transcription, en la laissant compactée.

Dès que l'acide rétinoïque se fixe sur le RAR, l'hélice H12 du LBD subit des changements conformationnels, générant une nouvelle surface d'interaction pour des co-activateurs. Ce changement de conformation permet en même temps le relargage des co-répresseurs. Le recrutement de ces co-activateurs permet le recrutement séquentiel de complexes impliqués dans le remodelage de la chromatine. Ces enzymes vont jouer sur l'acétylation ou la méthylation de lysine des histones pour remodeler la chromatine en euchromatine. Une fois activé, RAR recrute le médiateur, les facteurs généraux de transcription et l'ARN pol II pour déclencher la transcription du gène cible (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Rosenfeld et al., 2006).

A ce modèle de transcription peut s'ajouter un plus récent qui présente le RAR comme intervenant dans une réponse non génomique, faisant intervenir une cascade de kinases. En réponse à l'AR, RAR activerait la MAPK p38 (Alsayed et al., 2001; Gianni et al., 2002). P38 activerait à son tour MSK1 qui phosphoryle la S369 du LBD de RAR. Cette phosphorylation provoque un changement de conformation permettant le recrutement de TFIIH via sa sous-unité CDK7 (Keriel et al., 2002). Celle-ci phosphoryle ensuite la sérine 77 du NTD de RAR permettant l'interaction entre la cycline H de TFIIH et le LBD de RAR (Bour et al., 2005). Cette cascade de phosphorylation est suivie par celle de la sérine 10 de l'histone H3 par MSK1. Cela va provoquer un réarrangement de la chromatine, rendant accessible les éléments de réponse pour la fixation de l'hétéro-dimère RAR/RXR et déclencher la transcription du gène cible (Bruck et al., 2009).

III) Les maladies liées à un défaut de la NER

Les mutations des gènes codant pour les protéines de la NER sont associées à 13 syndromes cliniques bien distincts (**Figure 19**). Ces 3 maladies sont divisées en 7 groupes de complémentations, pour les patients XP (XP-A à XP-G et XP-V), 2 groupes pour le syndrome de Cockayne (CS-A et CS-B) et 4 groupes pour la Trichothiodystrophie (TTD-A, XP-B, XP-D et TTDN1). Chacun de ces groupes traduit une ou plusieurs mutations dans le gène correspondant. Cependant, certaines mutations dans un même gène comme par exemple, XPB, XPD ou XPG peuvent donner différentes maladies. Des mutations dans XPB et XPD peuvent être responsable de XP, XP/CS ou TTD (Duong and Rochette-Egly, 2011).

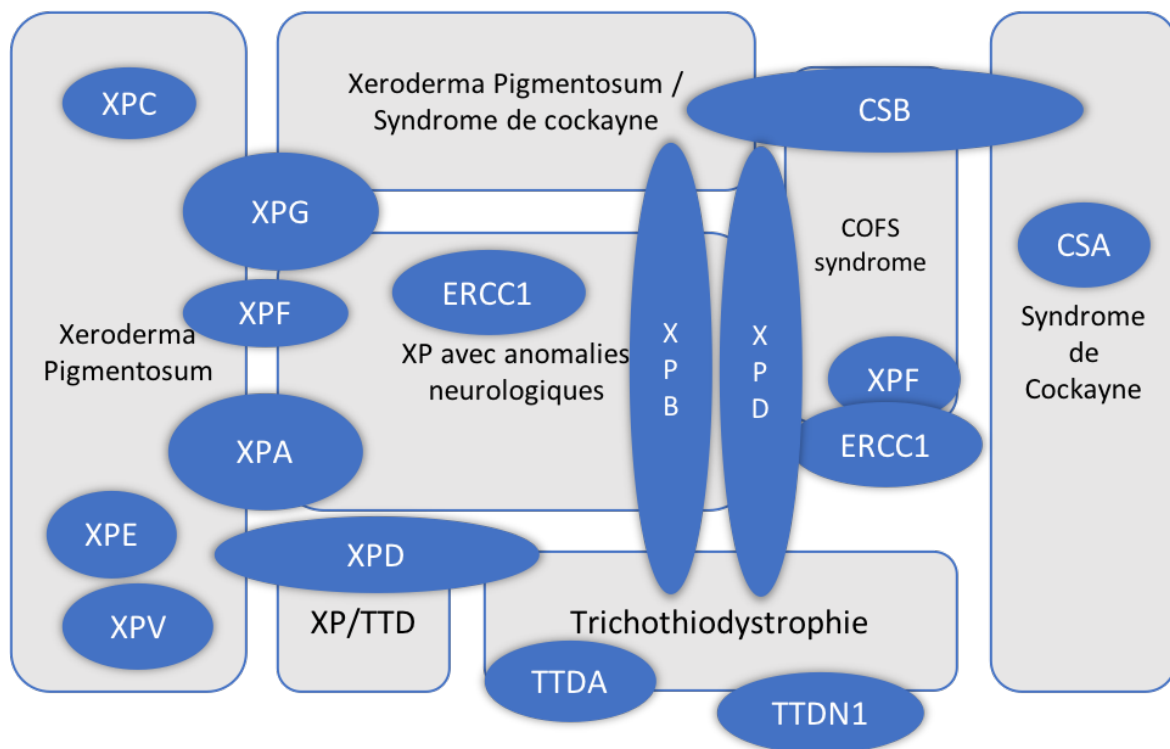


Figure 19 Relation entre les maladies et les gènes de la NER : adaptée de (DiGiovanna and Kraemer, 2012)

A) Xeroderma Pigmentosum (XP)

Le Xeroderma pigmentosum, derme sec et pigmenté en latin, est une maladie qui rend les patients extrêmement sensibles aux UVs, ce qui induit une hyperpigmentation de la peau et une forte hausse des risques de cancer de la peau. En effet, les risques sont 2 000 fois supérieurs pour les cancers à mélanomes et 10 000 fois supérieurs pour les cancers non-mélanomiens avant l'âge de 20 ans (Kraemer et al., 2007). Les premières manifestations apparaissent avant l'âge de 2 ans avec une forte augmentation du nombre de lentigines (taches brunes) sur les zones cutanées exposés au soleil (Bradford et al., 2011).



Patient XP

Certains patients peuvent aussi développer des problèmes oculaires strictement localisés sur les parties antérieures de l'œil (paupières, cornées et conjonctives) exposées aux UVs (Kraemer et al., 1994). Dans 25% des cas, les patients développent également des symptômes neurologiques, dont la sévérité et le moment de la première apparition peuvent considérablement varier. Cela comprend des réflexes ostéotendineux atténués ou manquants, une perte auditive progressive, des troubles de la parole et de la démarche, ainsi que le déclin cognitif (Dollfus et al., 2003; Ramkumar et al., 2011). L'incidence est variable en fonction de l'origine géographique. Aux États-Unis et en Europe, elle est de 1/1 000 000 de naissances. Dans les populations géographiquement isolées comme en Afrique du Nord ou au Japon, l'incidence est 10 fois plus élevée (Anttinen et al., 2008; Bradford et al., 2011). L'espérance de vie moyenne d'un patient XP est de 32 ans.

Cette pathologie est la résultante de mutations sur 8 gènes impliqués dans différentes étapes de la NER. Il existe 7 groupes de complémentations, XP-A à XP-G (mutation dans les gènes XPA à XPG) et un groupe supplémentaire avec moins de 10% des patients, dit XP variant, XP-V (Kleijer et al., 2008; Lehmann et al., 2011). Ces groupes de complémentation se produisent à des fréquences différentes et diffèrent par la sévérité des symptômes en ce qui concerne le développement du cancer de la peau et l'atteinte neurologique.

La maladie est caractérisée par la pléiotropie, ce qui signifie que différentes mutations dans un gène entraînent la manifestation de plusieurs caractéristiques phénotypiques différentes. En raison de l'implication des protéines XP dans divers processus cellulaires essentiels, tels que la réparation et la transcription de l'ADN, les corrélations génotype-phénotype sont particulièrement compliquées. Par exemple, les patients XP-C et XP-E présentent une faible sensibilité aux UVs et développent des troubles neurologiques que rarement. On peut expliquer cela par le fait que XPC et DDB2 ne jouent pas un rôle dans la TC-NER et donc les lésions présentes dans les gènes transcrits sont réparées (Schubert et al., 2014). Les patients XP-A présentent des symptômes plus sévères, avec des anomalies neurologiques importantes, s'expliquant par le fait que la protéine XPA joue un rôle dans la TC-NER mais aussi dans le GG-NER. Cependant, malgré le caractère pléiotrope de la maladie, une même mutation peut donner lieu à plusieurs phénotypes. Des mutations de XPG peuvent générer des patients atteints de XP ou XP/CS, des patients ayant les symptômes combinés des XP et des CS (Schubert et al., 2014; Venema et al., 1990). Le dernier groupe de complémentation, les patients "variants" (XP-V) ne sont pas spécialement sensibles aux UVs et ne développent pas de problèmes neurologiques. Mais ils ont une forte susceptibilité à développer des cancers de la peau (Lehmann et al., 1975). Ils présentent une mutation dans le gène pol H codant pour

l'ADN polymérase H capable de répliquer l'ADN sans être stoppée par une lésion.

Lors de ma thèse j'ai travaillé exclusivement sur la protéine XPC. Le groupe de complémentation XP-C (représentant environ 46 mutations différentes tout le long du gène *XPC*) représente 25 à 40% de tous les patients XP en particulier dans les pays d'Europe du Sud et d'Afrique du Nord. Contrairement aux autres XP, les patients XP-C ont très rarement des problèmes neurologiques (5 sur 122 individus répertoriés dans la littérature) à la différence des risques très accrus de développer des cancers non seulement cutanés mais également colorectaux, du poumon ou du sein. Tous les patients XP-C ont un GGR déficient qui corrèle très souvent avec un niveau d'expression très bas d'ARNm codant pour XPC (5 à 10% de la normale).

Lors de mes travaux, j'ai travaillé sur des fibroblastes issus d'une biopsie de peau prélevée sur 2 patients différents. Ces patients présentaient 2 mutations différentes du gène codant pour la protéine XPC. La première est une mutation sur la base 1840, remplaçant une cytosine par une thymine. Cette substitution génère un codon Stop au niveau de l'acide aminé 579 (XPC p.Arg.579*). La protéine est donc tronquée et raccourcie (Friedberg and Wood, 2007). Cette mutation a été détectée chez un enfant de Malatya en Turquie (XP67TMA), qui présentait une hypersensibilité à la lumière ainsi que de nombreux cancers de la peau. Il a développé dès l'âge de 1 an des lésions cutanées anormales, mais aucuns troubles neurologiques. Le premier cancer de la peau a été détecté à l'âge de 6 ans. Le patient est décédé à l'âge de 10 ans des suites de complication des nombreux carcinomes. Au niveau moléculaire, ces cellules (GM14867, nommé de XPC^{DEL} dans les publications) présentent un très faible niveau d'expression de l'ARNm pour XPC dû au processus de RNA decay. La deuxième mutation est la substitution d'une proline en position 334 par une histidine (XPC p.Pro334His). Cette mutation se trouve dans un domaine non conservé, en N-terminal. Ce patient (XP1MI) est un des rares patients XP-C présentant des troubles neurologiques (autisme et hyperactivité). Contrairement aux cellules du premier patient, ces fibroblastes (GM02096, nommé XPC^{MUT} dans les publications) présentent une expression normale de l'ARNm codant pour la protéine XPC (Gozukara et al., 2001). Au niveau moléculaire, ces 2 mutations ont donc des conséquences différentes. La mutation XPC p.Arg.579* perturbe le mécanisme de la NER, car la protéine XPC, non présente, ne peut être recrutée au niveau des dommages. Cette mutation perturbe donc aussi l'interaction qui doit se faire entre XPC et la machinerie de réparation (TFIIH, XPB, HR23B). Les effets de la mutation XPC p.Pro334His sont moins importants. XPC va se lier normalement aux dommages. Néanmoins, on observe un retard dans le recrutement de XPA et une perturbation de la fixation de TFIIH (Rivera-

Begeman et al., 2007).

B) Le syndrome de Cockayne (CS)

Tout comme XP, CS est une maladie autosomale récessive. Cette pathologie est caractérisée par des retards de croissance et des troubles neurologiques. Les patients présentent aussi une sensibilité aux UVs mais n'ont pas de prédisposition à développer des cancers de la peau. En Europe, l'incidence est de 1/200 000 naissances (http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=191). L'espérance de vie est de 12,5 ans (Bernardes de Jesus et al., 2008). Les retards de croissance donnent une apparence "âgée" et sont responsables de défauts squelettiques (tête en forme d'oiseau), associés à des troubles neurologiques (retard mental, démyélinisation...) et des troubles du développement des organes génitaux (Andressoo et al., 2005). Les troubles neurologiques sont importants chez les patients CS et se caractérisent par une forte perte de neurones, principalement dans le cortex cérébral. On peut aussi observer une distorsion des cellules de Purkinje, associée à une perte de la matière blanche (Nance and Berry, 1992).



Patient CS

Les CS peuvent être classés en fonction du degré de sévérité des symptômes. La classe I (CS I) comprend des patients dont les premiers symptômes apparaissent dans la première année de vie et dont l'espérance de vie est inférieure à 20 ans. La classe II (CS II) regroupe les quelques cas rares de patients présentant des symptômes plus sévères. Les patients de la classe III (CS III) présentent des symptômes moins importants. La quatrième classe porte le nom de COFS (cérébro oculo facto skeletal syndrome). Elle constitue une forme prénatale très sévère de CS qui se caractérise par une photosensibilité cutanée, microcéphalie et cataractes congénitales... (Koob et al., 2010). Elle constitue la forme la plus extrême du Syndrome de Cockayne.

Le CS résulte dans 80% des cas d'une mutation au niveau du gène CSB et dans 20% des cas, du gène CSA (Laugel et al., 2010). Cependant, certains des patients COFS présentent des mutations dans le gène ERCC1 (Licht et al., 2003), dans le gène XPD (Jaspers et al.,

2007) et XPG (Graham et al., 2001). Ces patients présentent donc un défaut spécifique de la TC-NER, mais certains phénotypes CS ne peuvent pas être expliqués par le seul défaut de cette voie de réparation. Les travaux entrepris au sein du laboratoire, ont montré que CSA et CSB étaient impliqués dans d'autres processus cellulaires comme la transcription, en y jouant un rôle dans l'initiation de la transcription et le maintien de la chromatine (Epanchintsev et al., 2017; Koch et al., 2014)

C) La Trichothiodystrophie (TTD)

La TTD se caractérise principalement par un déficit en protéines soufrées qui conduit à des cheveux et des ongles cassants. Les patients développent également de l'ichtyose, se traduisant par un dessèchement de la peau et la présence de squame. Certains patients présentent des troubles neurologiques sévères, ainsi que des anomalies du développement s'associant avec des retards de croissance et des retards mentaux semblables à ceux des CS. Tous les patients ne sont pas photosensibles (Newman et al., 2006; Proietti-De-Santis et al., 2006). Les patients atteints de TTD manifestent un large spectre de caractéristiques cliniques et, par conséquent, différents noms sont utilisés pour décrire leurs phénotypes, PIBIDS, IBIDS, et BIDS (Stefanini et al., 2010). Néanmoins, les TTD ne développent pas d'anomalies pigmentaires ni de cancer de la peau. L'incidence est estimée à 1/1 000 000 de naissance et pour le moment, seulement 100 cas ont été reportés (Crovato et al., 1983).



Patient TTD

Trois gènes ont été identifiés comme responsable de la forme photosensible des TTD: XPB, XPD et p8/TTDA. Ces gènes codent pour différentes sous-unités du facteur de transcription TFIIH qui est connu pour son implication dans différents processus cellulaires ce qui pourrait expliquer les différentes formes connues de TTD. Au niveau cellulaire, les cellules de patient présentent un très faible taux de TFIIH. Les mutations de XPB sont rarement viables, du fait de son rôle essentiel de translocase tandis que XPD n'est pas nécessaire pour la transcription basale in vitro (Moreland et al., 1999). Le 3^{ème} gène touché a été identifié comme la 10^{ème} sous-unités de TFIIH (Moreland et al., 1999). Les phénotypes p8/TTD-A sont moins sévères car l'absence de p8 n'est pas létale. TTD-A permet de réguler la concentration nucléaire de

TFIIH en améliorant la stabilité du complexe lors de la transcription. Il joue aussi un rôle dans la réparation en stimulant l'activité ATPase de XPB, ce qui permet d'ouvrir l'ADN (Giglia-Mari et al., 2004). La forme non photo-sensible de TTD est appelé TTDN1. Le premier cas a été décrit en 1988 (Coin et al., 2006). À ce jour, cependant, on sait peu de choses sur le rôle de TTDN1 dans l'étiologie de la TTD. Ces mutations n'ont été détectées que chez quelques patients atteints de TTD, suggérant que d'autres facteurs sont également responsables du type de TTD non photosensible. Les patients TTDN1 manifestent également d'autres symptômes, tels qu'un "bone age" retardé, des troubles épileptiques et un comportement autistique, cependant, ils sont exempts d'autres manifestations typiquement trouvées dans TTD, telles qu'une taille réduite, l'infertilité ou la démyélinisation (Fois et al., 1988).

IV) Les facteurs NER: Nouveaux facteurs de transcription

Comme vu précédemment, la transcription des gènes de classe II est un processus fondamental dans la cellule, qui fait intervenir l'ARN pol II et de nombreux facteurs. L'ADN utilisé lors de la transcription doit être étroitement surveillé afin qu'aucunes lésions ne viennent l'altérer. Une telle connexion entre la transcription et la réparation de l'ADN a été une première fois mise en évidence quand il a été montré que lors d'une attaque génotoxique, les gènes situés sur le brin transcrit sont préférentiellement réparés (Bohr et al., 1985). Plusieurs années plus tard, notre laboratoire a montré que TFIIH premièrement identifié comme un facteur général de la transcription, était aussi impliqué dans la voie de réparation NER (Compe and Egly, 2012). Depuis 15 ans, la liste des nouveaux acteurs de la transcription s'agrandit, et on y retrouve de plus en plus de facteur de réparation de l'ADN (**Tableau 8**). Il est intéressant d'observer que en plus de TFIIH, les autres facteurs de la NER présentent cette dualité fonctionnelle (Bradsher et al., 2002; Fong et al., 2012; Iben et al., 2002; Le May et al., 2010b).

En effet, à la fin des années 90, un complexe contenant l'ARN pol II et les facteurs NER a été purifié (Maldonado et al., 1996). La protéine CSB d'abord décrite pour son rôle dans la TC-NER, a aussi été observé lors de la transcription. CSB est une ATPase faisant partie de la famille SWI/SNF, capable de remodeler la chromatine en interagissant avec le cœur du nucléosome (Citterio et al., 1998; Newman et al., 2006). De plus, il interviendrait dans la transcription en interagissant avec l'ADN, l'ARN pol II et l'ARN naissant (Tantin et al., 1997), puis stimulerait l'élongation de la transcription in vitro (Selby and Sancar, 1997). En plus de son rôle dans la transcription par l'ARN pol II, CSB permet l'activation de la transcription dépendante de l'ARN pol I en interagissant avec elle et la méthyltransférase G9a. Cette coopération permettrait la méthylation de H3K9, couplée à l'association de HP1 permettant la

Protéine	Voie de réparation	Activité enzymatique	Fonction dans la réparation	Fonction dans la transcription
CSB	NER	ATPase dépendante de ADN	Initie la TC-NER	Remodelage de la chromatine ATP-dépendante, Stimule la transcription
DNA-PKcs	NHEJ, BER	Kinase	Facilite la fin de la NHEJ par l'autophosphorylation, Peut stimuler la BER	Facilite l'activation de la transcription par le remodelage de la chromatine, module l'activité des facteurs de la transcription
FANCD2	ICL	Non déterminée	Initie la réparation ICL	Active la transcription de <i>TAp63</i> et favorise la senescence des cellules tumorales.
FANCP	ICL	Non déterminée	Agit comme une plateforme pour des endonucléases	Coopère avec FANCD2 pour l'activation transcriptionnel
TFIIH	NER	Kinase, hélicase ATP dépendante	Ouvre l'ADN sur les sites des lésions, facilite l'incision de XPF	Ouvre l'ADN au niveau des promoteurs, phosphoryle le domaine CTD de la pol II, Phosphoryle les récepteurs nucléaires et co-activateurs
PARP-1	NHEJ, HR, BER, NER	Poly (ADP-ribosyl)transférase ADN dépendante	Interagit physiquement et fonctionnellement avec des facteurs de la NHEJ, HR, BER et NER	Module la structure de la chromatine, fonctionne comme un co/activateur ou un répresseur, Poly (ADP-ribosyl)ate les facteurs remodelant la chromatine
TDG	BER	glycosylase	Excise les bases azotées	Régule la méthylation de l'ADN des régions régulatrices,
XPC/RAD23 /CETN2	GG-NER, BER	Non déterminée	Initie la GG-NER, stimule la BER via TDG	Active la transcription des gènes régulés par les récepteurs nucléaires, co-activator pour OCT4 et SOX2 dans les cellules souches embryonnaires, connecte CBP et p300 aux autres facteurs de la transcription et aux NRs
XPF	NER, ICL	endonucléase	Incise le brin lésé en 5'	Favorise la déméthylation de l'ADN au niveau des terminateurs des gènes régulés par les récepteurs nucléaires, recrute CTCF et facilite la formation de boucle au niveau des gènes régulés par les récepteurs nucléaires, Stimule l'initiation de la transcription
XPG	NER	endonucléase	Incise le brin lésé en 3'	Stabilise TFIIH, Favorise la déméthylation de l'ADN au niveau des promoteurs des gènes régulés par les récepteurs nucléaires, recrute CTCF et facilite la formation de boucle au niveau des gènes régulés par les récepteurs nucléaires

Tableau 8 Les facteurs de réparation dans la transcription: ICL : inter-strand cross-link repair (adaptée de (Fong et al., 2013))

transcription de l'ADN ribosomique (Yuan et al., 2007). De plus, CSB et CSA régulent positivement la transcription en permettant l'ubiquitination du répresseur ATF3 (Alekseev et al., 2017)

L'homologue de XPG chez la levure, Rad2 peut interagir avec la sous-unité Med17 du complexe du Médiateur. Le Médiateur pourrait jouer un rôle dans la réparation de l'ADN en amenant Rad2 au niveau des gènes actifs, ou bien Rad2 pourrait être impliqué dans la transcription, influençant la formation du PIC (Eyboulet et al., 2013). Il a aussi été démontré que XPG interagit avec TFIIH via XPD pour former un complexe stable actif en réparation et en transcription (Ito et al., 2011). Des mutations de XPG chez des patients XP/CS sont responsables d'une perturbation de l'architecture de TFIIH. Cela a pour conséquence une absence de phosphorylation des récepteurs nucléaires et une dérégulation de l'expression des gènes contrôlés par ces récepteurs. XPG est aussi nécessaire pour la déméthylation de l'ADN avec Gadd45 α lors de la transcription (Barreto et al., 2007).

Récemment des travaux ont démontré que XPF est présent au niveau de promoteurs de gènes actif *in vivo* et facilite les modifications des histones pour la transcription lors du développement des mammifères, via son interaction avec TFIID (Kamileri et al., 2012).

Notre laboratoire s'est naturellement intéressé aux rôles que pouvaient avoir les différents facteurs NER dans la transcription. En 2010, en utilisant le modèle des gènes régulés par le récepteur à l'acide rétinoïque, nous avons démontré qu'un recrutement séquentiel des facteurs NER avait lieu au niveau du promoteur de RAR β 2, en l'absence de stress génotoxique. De plus, l'absence des facteurs NER diminue significativement la réponse transcriptionnelle dépendant de RAR. Cette baisse de la réponse transcriptionnelle est concomitante à une diminution des PTMs et de la déméthylation de l'ADN (Le May et al., 2010a). En 2012, nous avons démontré que l'expression optimale de RAR β 2 nécessite des cassures d'ADN induites par les endonucléases XPG et XPF, permettant alors le recrutement de CTCF et la formation d'une boucle entre le promoteur et le terminateur du gène RAR β 2. De plus, XPG permet la déméthylation de l'ADN au niveau du promoteur alors que XPF au niveau du terminateur (Le May et al., 2012a). Enfin en 2015, nous avons travaillé -plus spécifiquement sur TFIIH. Nous avons démontré que des mutations dans ses sous-unités XPB, XPD empêchaient la formation du PIC au niveau du promoteur de RAR β 2. Ces mutations ont aussi un impact sur le recrutement des facteurs ainsi que sur les fonctions telles que le remodelage de la chromatine, les modifications d'histones, la déméthylation de l'ADN et la formation de boucles entre promoteur et terminateur (Singh et al., 2015).

En ce qui concerne XPC, nos travaux de 2010 mettent bien en évidence son rôle primordial pour recruter les autres facteurs de la NER au niveau de RAR β 2. En effet, la présence de XPC est un prérequis pour le recrutement séquentiel des autres facteurs dans l'ordre suivant : XPC, XPA, XPG, XPF/ERCC1/Gadd45 α . De plus en son absence, on observe une diminution des modifications post-traductionnelles des histones comme H3K4me2/3, H3K9/K14ac, H4K16ac, H2Bub mais aussi une diminution de la déméthylation de l'ADN (Le May et al., 2010a).

XPC était déjà connu pour son rôle d'activateur de la transcription des gènes OCT4/SOX2 dans les cellules ES. XPC est aussi retrouvé sur les enhancers de plus de 70% de gènes ciblés par OCT4/SO2. Il est aussi capable de réguler la transcription de *Nanog* en absence des autres protéines de la NER (Fong et al., 2011). En plus d'être un co-activateur transcriptionnel pour OCT4/SOX2, XPC aide à la déméthylation de l'ADN via TDG, dans les cellules souches somatiques et pluripotentes (Ho et al., 2017).

V) Problématique

Ces découvertes sur le nouveau rôle des facteurs NER ont soulevé beaucoup de questions. En effet, ces nouveaux rôles pourraient expliquer certains symptômes des patients XP, CS et TTD. C'est naturellement que le sujet de ma thèse s'est orienté sur la compréhension de ces nouveaux mécanismes. Le but de ma thèse a été de mieux comprendre les fonctions des facteurs NER au niveau de la régulation de l'expression des gènes. Mon travail durant ces trois dernières années s'est focalisé sur le facteur XPC en déterminant son rôle transcriptionnel à l'échelle génomique afin de mieux comprendre les conséquences de sa dérégulation dans un contexte pathologique. En ce sens, mon second objectif a été de caractériser au niveau moléculaire l'étiologie de nouveaux patients XP en analysant de manière combinée les événements moléculaires de la NER et la transcription associés à XPC.

Résultats

Liste des articles :

- 1- **XPC is an RNA Polymerase II cofactor recruiting ATAC to promoters by interacting with E2F1**

Bidon B., Iltis I., Semer M., Nagy Z., Larnicol A., Cribier A., Benkirane M., Coin F., Egly J-M. & Le May N.- Accepté par Nature Communications

- 2- **XPC triggers acetylation of H2A.Z by KAT2A to recruit the chromatin remodeler BRD2 and initiate retinoic-acid dependant gene expression.**

Semer M., Bidon B., Larnicol A., Coin F. & Le May N. (finalisation de l'article)

- 3- **Xeroderma Pigmentosum Groups C and A in Algerian Patients with deregulation of both Transcription and DNA Repair.**

N. Le May, N. Calmels, Y. Abiyad, L. Boukli, M. Semer, A. Serradj, J.M. Egly, V. Laugel

Publication 1

XPC is an RNA Polymerase II cofactor recruiting ATAC to promoters by interacting with E2F1

Bidon B., Iltis I., Semer M., Nagy Z., Larnicol A., Cribier A., Benkirane M., Coin F., Egly J-M.
& Le May N.

Acceptée par Nature Communications, Publication Juillet 2018

Résumé:

The DNA damage sensor XPC is involved in DNA repair. Here we show that in the absence of damage, XPC concentrates on some class II promoters and co-localized with RNA Polymerase II (Pol II) and active post-translational histone modifications marks in human fibroblasts. XPC depletion results in the deregulation of gene expression linked to a drop in the deposition of histone H3K9 acetylation mark and pre-initiation complex formation at promoters. XPC interacts with the Histone Acetyl-Transferase KAT2A and specifically triggers the recruitment of the KAT2A-containing ATAC complex to the promoters of downregulated genes. We show that a strong E2F1 signature characterizes the XPC/KAT2A-bound promoters and that XPC interacts with E2F1 and promotes its binding to its DNA element. Our data reveal that the DNA repair factor XPC is also an RNA Polymerase II cofactor recruiting the ATAC coactivator complex to promoters by interacting with the DNA binding transcription factor E2F1.

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-018-05010-0

OPEN

XPC is an RNA polymerase II cofactor recruiting ATAC to promoters by interacting with E2F1

B. Bidon^{1,2,3,4}, I. Iltis^{1,2,3,4}, M. Semer^{1,2,3,4}, Z. Nagy^{1,2,3,4}, A. Larnicol^{1,2,3,4}, A. Cribier⁵, M. Benkirane⁵, F. Coin^{1,2,3,4}, J.-M. Egly^{1,2,3,4} & N. Le May^{1,2,3,4}

The DNA damage sensor XPC is involved in nucleotide excision repair. Here we show that in the absence of damage, XPC co-localizes with RNA polymerase II (Pol II) and active post-translational histone modifications marks on a subset of class II promoters in human fibroblasts. XPC depletion triggers specific gene down-expression due to a drop in the deposition of histone H3K9 acetylation mark and pre-initiation complex formation. XPC interacts with the histone acetyltransferase KAT2A and specifically triggers the recruitment of the KAT2A-containing ATAC complex to the promoters of down-expressed genes. We show that a strong E2F1 signature characterizes the XPC/KAT2A-bound promoters and that XPC interacts with E2F1 and promotes its binding to its DNA element. Our data reveal that the DNA repair factor XPC is also an RNA polymerase II cofactor recruiting the ATAC coactivator complex to promoters by interacting with the DNA binding transcription factor E2F1.

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, BP 163 Illkirch Cedex, 67404 C.U. Strasbourg, France. ²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, 67404 Illkirch, France. ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, 67404 Illkirch, France. ⁴Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France. ⁵Institut de Génétique Humaine, Laboratoire de Virologie Moléculaire, Université de Montpellier, CNRS UMR9002, 34000 Montpellier, France. These authors contributed equally: B. Bidon, I. Iltis. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.C. (email: fredr@igbmc.fr) or to J.-M.E. (email: egly@igbmc.fr) or to N.L.M. (email: nlemay@igbmc.fr)

Gene expression is constantly compromised by genotoxic stress that challenges genome integrity and requires the function of several DNA repair pathways to remove DNA lesions. This implies that there must be connections between the disparate events of transcription and DNA repair to orchestrate the expression and repair of genes. A link between DNA repair and transcription was first established after the discovery of a nucleotide excision repair (NER) sub-pathway removing DNA lesions located on the actively transcribed strand blocking elongating RNA polymerase II (Pol II) called the transcription coupled repair (TCR)¹. This was followed by the characterization of the basal transcription TFIIH as a NER factor involved both in TCR and in global genome repair (GGR), eliminating DNA damage from the entire genome^{2,3}. This interplay is even tighter, since studies also revealed roles for the other NER factors (CSB, XPC, XPA, XPG, and XPF/ERCC1) in gene expression^{4–6}.

Understanding the roles played by NER factors is of prime importance not only to unveil the molecular details of gene expression but also to understand how mutations in their corresponding genes give rise to several human autosomal recessive disorders like Xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS), and trichothiodystrophy (TTD). Patients bearing mutations in XPC only develop XP (XP-C) and represent the most frequent NER-defective group. XP is clinically characterized by an extreme sensitivity to ultraviolet (UV) rays from sunlight. XP patients develop severe sunburns and are highly susceptible to develop tumors on sunlight-exposed areas of the skin, including melanoma and squamous cell carcinoma⁷. XP individuals also present increased susceptibility for lung, breast, and colorectal cancers with possible neurological issues⁸. The XP pathology has been primarily defined as a DNA repair syndrome due to the inability of patients' cells to eliminate DNA lesions. However, studies during the last decade suggest that some of their phenotypes may also stem from transcriptional deregulations⁹.

Upon NER, XPC, with its partner hHR23B, recognizes all along the genome DNA-distorting lesions inflicted by endogenous and exogenous genotoxic attacks like UV irradiation, thereby initiating only the GGR sub-pathway¹⁰. Several observations suggest that XPC is additionally involved in the modifications of the chromatin environment surrounding the DNA lesions, including histone post-translational modifications (PTMs)^{11–13}. We have shown earlier that NER factors are associated with the Pol II transcription machinery and are sequentially recruited at the promoter of transcribed genes⁶. The presence of these NER factors at promoter is required to achieve optimal chromatin remodeling, including histone PTMs as well as active DNA demethylation, DNA break induction, and gene looping^{6,14}. Furthermore, a complex containing XPC and Oct4/Sox2 has been identified as a coactivator in embryonic stem (ES) and induced pluripotent stem cells^{15,16}. Although the involvement of XPC in transcription is established, its mechanistic role remains largely elusive as well as its transcriptional partners in the pre-initiation complex.

In the present study, we investigated the roles of XPC in class II gene expression. We first assessed the genome-wide localization of XPC and revealed that in the absence of a genomic stress, XPC is mainly recruited to the promoters of active genes where it co-localizes with Pol II. Depletion of XPC leads to deregulation of Pol II recruitment and altered histone marks at promoters, including H3K9ac. We further identified an interaction between XPC and the histone acetyltransferase (HAT) lysine acetyltransferase 2A KAT2A (or GCN5). Our data indicated that XPC, through its interaction with KAT2A, could be associated with both ATAC and SAGA complexes but that only ATAC is detected at the promoters of XPC-dependent genes. GREAT analysis unveiled that a strong E2F1 signature characterizes genes

regulated by XPC/KAT2A. We showed that E2F1 interacts with XPC and is required for its localization at the promoter of activated genes. We subsequently identified a complex, including XPC, E2F1, and KAT2A that is specifically recruited to XPC-dependent promoters, conditioning the presence of the ATAC complex and the deposition of the H3K9ac mark. Altogether, our results establish XPC as a cofactor of Pol II, interacting with a transcription factor and recruiting a coactivator complex to remodel chromatin and initiate class II gene expression.

Results

Enrichment of XPC on promoters in the absence of genomic stress. To investigate the involvement of XPC upon transcription, we set forward to analyze transcription genome-wide in fibroblasts defective in endogenous XPC, hereafter called XP-C^{DEL} cell line (Fig. 1a)^{17,18}. Wild-type GFP-XPC cDNA was re-introduced into XP-C^{DEL} cells to be used as positive control cell line, hereafter called XP-C^{WT}¹⁹. All along the study, we also compared these two cell lines to another XP-C patient cell line bearing the XPC p.Pro334His mutation with mild phenotypes, in which XPC is mutated and expressed (Fig. 1a) and hereafter called XP-C^{MUT}¹⁷.

By employing the all-*trans* retinoic acid (ATRA) stimulus, which induces a well-characterized modification of the cellular transcriptional program^{6,14}, we sought to identify the XPC genomic distribution and its impact on gene expression in a well-defined system. We first analyzed the RA response in the three cell lines by studying the transactivation of *RARβ2* upon ATRA treatment. We observed a correlation at 6 h post ATRA treatment between *RARβ2* mRNA induction and recruitment of the transcriptional machinery (including RAR, Pol II, and TFIIH kinase CDK7), together with the NER factors (XPC, XPA, and XPG) at the *RARβ2* promoter in both XP-C^{WT} and XP-C^{MUT} cells (Fig. 1b and Supplementary Figure 1A). However, *RARβ2* transactivation and the concomitant recruitment pattern were largely abolished in XP-C^{DEL} cells characterized by the absence of XPC (Fig. 1b and Supplementary Figure 1A). We thus performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) followed by high-throughput DNA sequencing (ChIP-seq) in both XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells that were treated during 6 h with ATRA using antibodies directed against green fluorescent protein (GFP) and Pol II. Three independent series using XP-C^{WT} cells yielded 2191 and 16,440 peaks for GFP-tagged XPC and Pol II, respectively. We identified 1797 common binding events representing 82% of the XPC peaks (Fig. 1c). Using HOMER annotation, we observed that 32% of the XPC-binding events appeared at promoter regions (Fig. 1d). Moreover, the combination of 5' untranslated region and exon-annotated peaks (mostly located in the very first one) represented 44% of the XPC peaks, all located near the transcription starting site (TSS). Interestingly, 94% of these XPC-bound promoters also harbored an enrichment of Pol II (Fig. 1d).

RNA-seq analysis has been performed in parallel to ChIP-seq in the ATRA-treated XP-C^{DEL} cells and compared to XP-C^{WT}. Peak annotation of the 1797 common binding events between XPC and Pol II identified 1529 genes, whose expression varied after ATRA treatment indicating that they were presumably regulated by the presence of XPC. We observed that 283 genes were downregulated in the absence of XPC, whereas 241 genes were upregulated (Fig. 1e and Supplementary Data 1). Based on these results, we defined two groups of genes: one containing 283 genes positively regulated by XPC and the other containing 241 genes negatively regulated by XPC. The top-ranking Gene Ontology (GO) biological process with significant *p* values included chromatin-structure-related terms such as chromatin/nucleosome assembly,

DNA packaging, and protein-DNA organization that is in agreement with the well-defined role of XPC in genomic stability (Supplementary Figure 1B). As expected, the top-ranking GO

biological pathways were related to RAR-targeted genes but we also noticed numerous interferon (IFN) gamma-related genes (Supplementary Data 2).

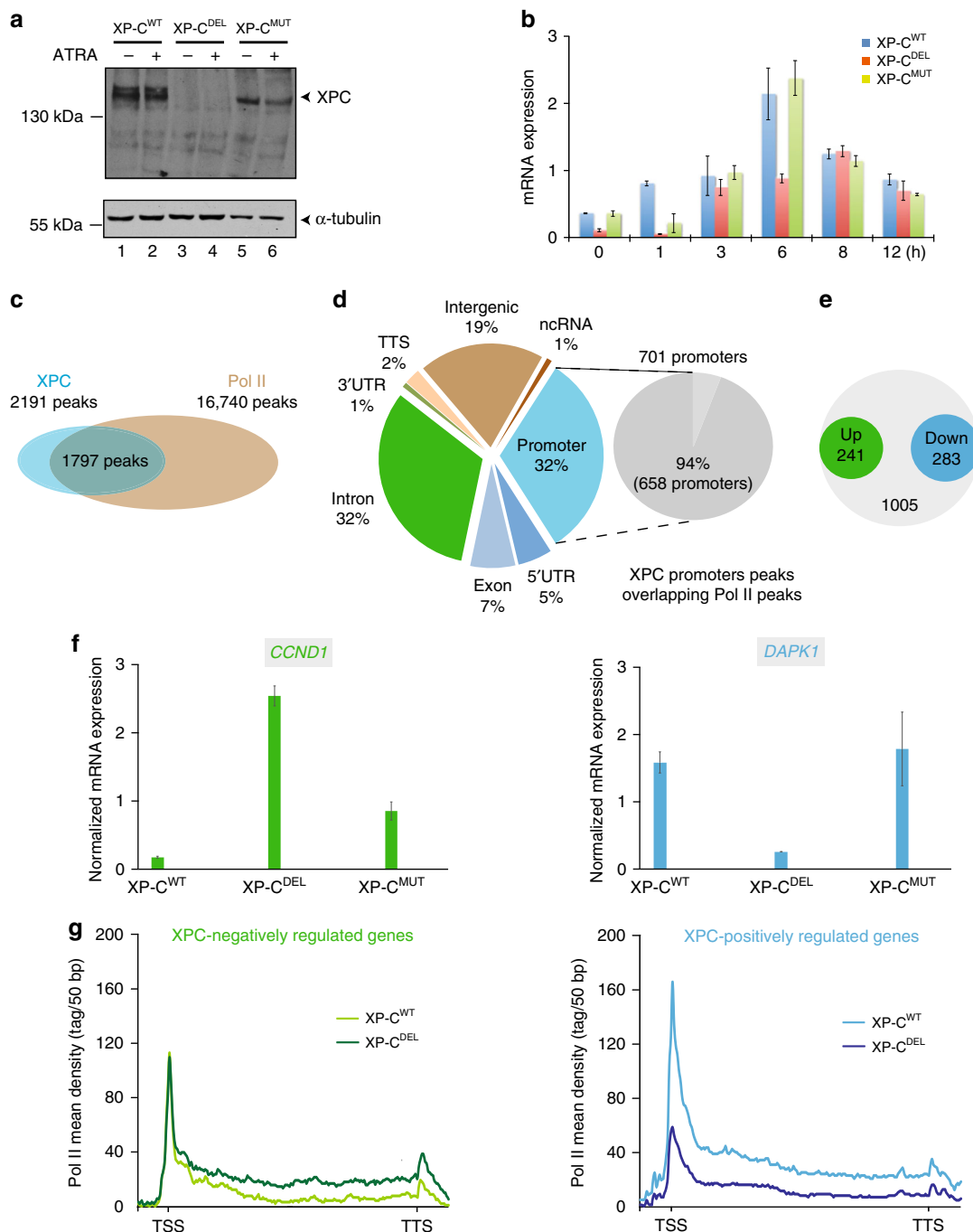


Fig. 1 Co-localization of XPC and Pol II genome-wide. **a** Relative protein expression of XPC and α -tubulin analyzed by western blotting of whole-cell extract from XP-C^{WT}, XP-C^{DEL}, and XP-C^{MUT} fibroblasts, in presence or absence of ATRA. **b** Relative mRNA expression of *RAR β 2* in XP-C^{WT}, XP-C^{DEL}, and XP-C^{MUT} fibroblasts, after ATRA treatment in 12-h time-course experiment. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments. **c** Overlapping of MACS14-determined peaks for both Pol II and XPC in XP-C^{WT} cells after ATRA induction. XPC and Pol II peaks correspond to recurrent peaks found in three independent ChIP-seq experiments. **d** HOMER annotation of the 2191 XPC peaks and proportion of promoter annotated peaks to overlap with a Pol II peak. **e** Expression level of XPC-bound genes identified by ChIP-seq were determined by RNA-seq by comparing both ATRA-treated XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells. Differential expression analysis of these genes in XP-C^{WT}, compared to XP-C^{DEL}, was then computed using EdgeR represented as a circle plot. XPC-negatively regulated genes (upregulated in XP-C^{DEL}) are enlightened in green and XPC-positively regulated genes (downregulated in XP-C^{DEL}) in blue. **f** Relative mRNA expression of two genes, *CCND1* as XPC-negatively regulated one and *DAPK1* as XPC-positively regulated one, after ATRA treatment in XP-C^{WT}, XP-C^{DEL}, and XP-C^{MUT} cells. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments. **g** Diagrams representing the mean tag density of Pol II ChIP-seq experiment for XPC-negatively regulated and -positively regulated genes, as they were previously determined in XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells

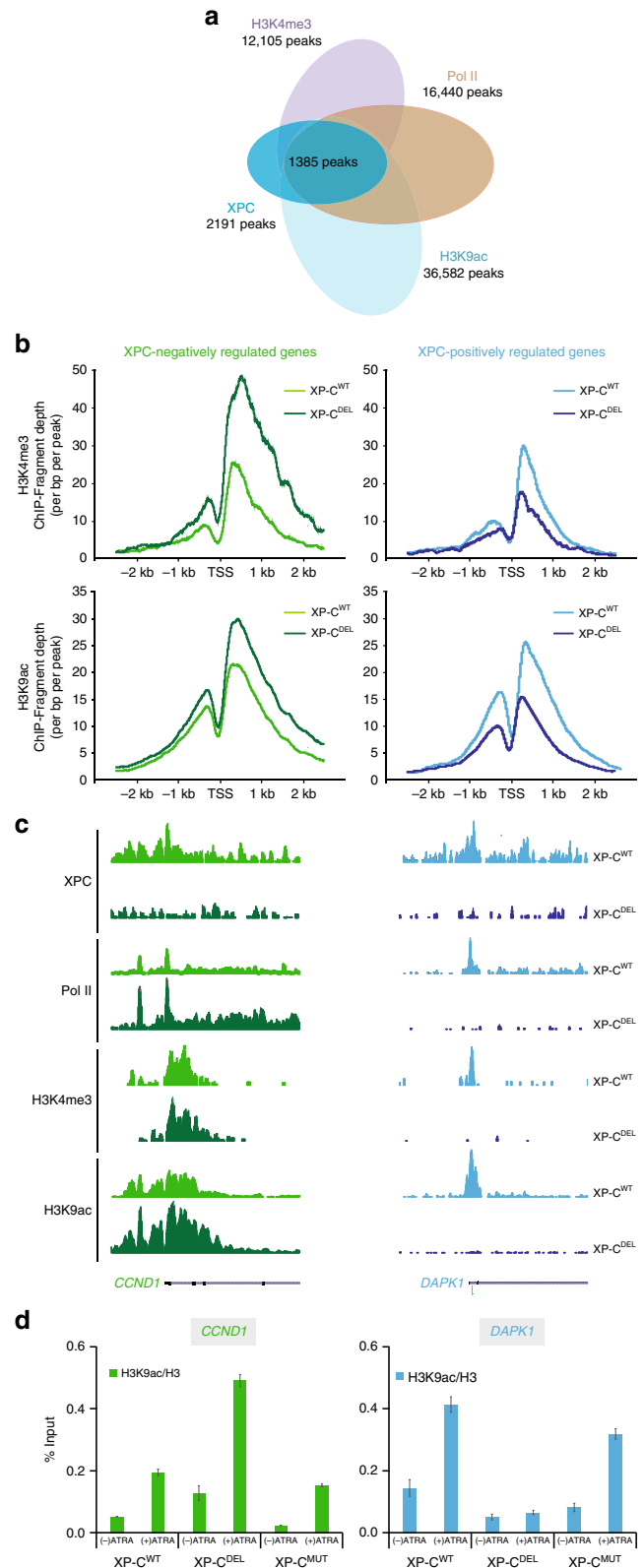
We subsequently validated RNA-seq by reverse transcription-PCR in XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells, using *CCND1* as representative of XPC-negatively regulated genes and *DAPK1*, *HOXB13*, and *LRRCL1* as representatives of XPC-positively regulated genes and observed that the expression of these genes was not modified by the XPC p.Pro334His mutation found in XP-C^{MUT} cells (Fig. 1f and Supplementary Figure 1E).

We next determined the mean tag density of Pol II for both XPC-positively and -negatively regulated genes in XP-C^{DEL} cells. We observed a lower occupancy of Pol II at TSS and along the gene body of the XPC-positively regulated genes in the absence of XPC (Fig. 1g, right panel), while Pol II enrichment was higher mainly along the gene body for the XPC-negatively regulated genes (Fig. 1g, left panel). ChIP experiments targeting the *CCND1* or *DAPK1* promoter recapitulated ChIP-seq data (see also additional XPC-positively regulated genes in Supplementary Figure 1F, top panels). Finally, to rule out the possibility that our observations were due to an overexpression of XPC in the rescued XP-C^{WT} cells, we tested and compared rescued XP-C^{WT} fibroblasts with MRC-5 cells showing similar inductions of XPC-target genes and comparable recruitments by ChIP upon ATRA treatment in these two cell lines (Supplementary Figure 1C-D).

Collectively, our findings established an enrichment of XPC around promoters that strongly correlates with Pol II at TSSs, regulating more than 500 genes.

Enrichment of XPC correlates with positive histone PTMs. We next investigated the correlation between the presence of XPC and the deposition of positive histone marks at TSS. We performed a comparative ChIP-seq analysis using both ATRA-treated XP-C^{DEL} and XP-C^{WT} cells for H3K9ac and H3K4me3 marks. Among the 1797 common binding events between XPC and Pol II detected in XP-C^{WT} cells, 1756 (98%) were localizing with H3K9ac and 1385 (78%) with both H3K9ac and H3K4me3 (Fig. 2a). Interestingly, ChIP-seq data comparison between XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells, considering previously identified XPC-regulated genes, showed a correlation between their expression levels, the enrichment of Pol II, and the deposition of the transcription-positive histone marks. Indeed, the fragment depth for H3K9ac and H3K4me3 was higher at promoters of the XPC-negatively regulated genes while they remained lower for XPC-positively regulated genes in XP-C^{DEL} cells compared to XP-C^{WT} cells (Fig. 2b). Distribution of these histones marks along the representative genes *CCND1* and *DAPK1* is shown in Fig. 2c and ChIP on their promoters in Fig. 2d (see also supplemental genes in Supplementary Figure 1F, lower panels). In contrast, and in agreement with the normal expression of *CCND1* and *DAPK1* in XP-C^{MUT} cells compared to XP-C^{WT} cells (Fig. 1f), the deposition of H3K9ac and H3K4me3 on the promoter of these genes was not modified in XP-C^{MUT} cells (Fig. 2d and Supplementary Figure 1F, lower panels).

To exclude the false positive results due to the use of XPC^{WT} cells overexpressing XPC, we also analyzed HeLa cells constitutively expressing short hairpin RNA either directed against XPC (shXPC), XPA (shXPA), or scrambled (shCtrl) overtime treated with ATRA (Supplementary Figure 2A, left panel). We observed lower induction of mRNA *RARβ2* synthesis, 6 h post ATRA treatment in shXPC and shXPA cells, compared with shCTL cells (Supplementary Figure 2A, middle panel). We also determined the transcriptome profiles of shCtrl, shXPC, and XP-C^{DEL} cells by comparing mRNA induction in untreated and 6 h ATRA-treated cells. In shCtrl cells, 77 genes show a fold induction >2, including several well-characterized genes, such as *RARβ2* (Supplementary Figure 2B, Supplementary Data 4, and Supplementary Methods). Surprisingly, ~90% of genes activated in shCtrl showed a lower



induction in both shXPC and XP-C^{DEL} cells (Supplementary Figure 2B and Supplementary Data 4). The *RARβ2* mRNA induction at 6 h post ATRA treatment in shCtrl cells followed the recruitment of the transcriptional machinery together with the NER factors at the promoter (Supplementary Figure 2A, right panels)⁶. This concomitant recruitment pattern was abolished in

Fig. 2 Association of XPC-bound promoters with active histone PTMs. **a** Overlapping of peaks for Pol II and XPC with PTMs H3K4me3 and H3K9ac in XP-C^{WT} cells after ATRA induction. These peaks correspond to recurrent peaks found in three independent ChIP-seq experiments. **b** Diagrams representing the fragment depth of H3K9ac and H3K4me3 ChIP-seq experiment for XPC-negatively regulated (left panels) and XPC-positively regulated (right panels) genes, as they were previously determined in XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells. **c** UCSC genome browser for XPC, Pol II, H3K4me3, and H3K9ac at *CCND1* and *DAPK1* promoters as XPC-negatively regulated and XPC-positively regulated genes, respectively. **d** Relative enrichment of H3K9ac/H3 monitored by ChIP at *CCND1* and *DAPK1* promoters as XPC-negatively regulated and XPC-positively regulated genes. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments

shXPC and shXPA cells, although XPC was still detected in the latter one (Supplementary Figure 2A, right panels). While the deposition of H3K9ac and H3K4me3 was detected after ATRA treatment at the promoter upon *RARβ2* transactivation in shCtrl cells, such enrichment was not observed in shXPC cells. Similar results concerning the deposition of histone marks at *RARβ2* promoter were obtained in the corresponding XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells (Supplementary Figure 2D, right panel). Interestingly, the deposition of the two histone marks was not disturbed by the absence of XPA in shXPA cells in which normal recruitment of XPC was detected (Supplementary Figure 2D, left panel).

Altogether, these results indicated that the genome-wide recruitment of XPC at promoters correlated with transcriptionally active H3K9ac and H3K4me3 marks. They also indicated that XPC was recruited to promoters before XPA in order to initiate histone PTMs at the TSS.

XPC and KAT2A are recruited to XPC-positively regulated genes. We next wondered which enzyme(s) could be responsible for the histone marks deposition at the TSS of XPC-regulated genes. Given the role of KAT2A in the deposition of H3K9ac in transcription initiation²⁰, we assessed whether the variations of H3K9ac at promoters targeted by XPC could be related to this HAT.

We thus performed ChIP-seq in both XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells treated 6 h with ATRA, using antibodies directed against KAT2A, and obtained 19,758 genomic locations for KAT2A compared with input. Using HOMER annotation, we observed almost 50% of these KAT2A-binding events appearing at promoter regions (Supplementary Figure 3A). Among the previously determined XPC and Pol II co-occupied positions, we identified 948 common binding events with KAT2A (Fig. 3a). Interestingly, KAT2A was absent from promoters of the XPC-positively regulated genes in XP-C^{DEL} cells lacking XPC, which correlates with a decrease in H3K9ac (Fig. 3b, right panel compared with Fig. 2b). Surprisingly, KAT2A was detected around TSS of XPC-positively regulated genes only in the presence of XPC in XP-C^{WT} cells while the HAT was hardly detected at XPC-negatively regulated genes with or without XPC, in XP-C^{WT}, or XP-C^{DEL}, respectively (Fig. 3b). Distribution of KAT2A along the representative genes *CCND1* and *DAPK1* is shown in Fig. 3c. We confirmed by ChIP that KAT2A recruitment correlated with an increase H3K9ac at the promoter of *DAPK1* in XP-C^{WT} cells upon ATRA treatment while the HAT was not detected at *CCND1* (Fig. 3d compared with Fig. 2d and also Supplementary Figure 3B for two additional genes). This recruitment was lost for *DAPK1* in the absence of XPC in XP-C^{DEL} cells concomitantly with the decreased histone PTMs, while

we did not observe any change in XP-C^{MUT} cells (Fig. 3d compared with 2d). Interestingly, we did not detect the closely related paralog of KAT2A, KAT2B (or PCAF)^{20,21}, on the representative *CCND1* and *DAPK1* promoters by ChIP (Fig. 3d and Supplementary Figure 3B for additional genes). We also detected KAT2A concomitantly with an increase of H3K9ac signal at the activated *RARβ2* promoter in shCTL, XP-C^{MUT}, XP-C^{WT}, and shXPA cells (Supplementary Figure 2D). Interestingly, KAT2A was not detected in the absence of XPC in XP-C^{DEL} and shXPC cells (Supplementary Figure 2D). Finally, ChIP-reChIP assays showed that XPC and KAT2A co-occupied *RARβ2* promoter in shCtrl but not in shXPC cells, using both combinations of co-immunoprecipitation (co-IP; XPC/KAT2A or KAT2A/XPC) (Supplementary Figure 3C). These results are comparable to the XPC/Pol II co-occupancy detected at this promoter (Supplementary Figure 3C)⁶. Note that KAT2A was stable in all the cell lines (Supplementary Figure 2C). Taken together, our results point to a correlation between the recruitment of XPC and KAT2A and the deposition of H3K9ac at promoters of XPC-positively regulated genes.

XPC recruits ATAC to XPC-positively regulated genes. To deepen the correlation between XPC and KAT2A established above, we next assessed their co-location in a complex and their putative interaction. KAT2A co-precipitated a complex containing XPC in nuclear extracts from untreated XP-C^{WT} (Fig. 4a). As expected, such co-precipitation was not detected using nuclear extracts from untreated XP-C^{DEL}. Furthermore, recombinant KAT2A was able to pull down the recombinant tagged heterodimer XPC/hHR23B in vitro indicating a direct interaction between them (Fig. 4b).

KAT2A is found in two functionally distinct coactivator complexes, SAGA (Spt Ada Gcn5 Acetyltransferase) and ATAC (Ada Two A Containing)^{20,22}. These complexes contain either KAT2A or KAT2B. We thus investigated whether the complex containing XPC and KAT2A could be associated with SAGA and/or ATAC. IP experiments using nuclear extracts from untreated XP-C^{WT} showed that both SAGA and ATAC subunits (TRRAP and ZZZ3, respectively) co-precipitated the complex containing either XPC or KAT2A (Supplementary Figure 4A). IPs of SAGA or ATAC performed with antibodies against the specific subunits TRRAP and ZZZ3, respectively, led to the detection of XPC (Fig. 4c). Interestingly, KAT2B was not immunoprecipitated by XPC although it was detected both in the SAGA and ATAC complexes, indicating the presence of a complex containing XPC and KAT2A HAT in untreated XP-C^{WT} cells (Fig. 4c). We noticed that the integrity of the ATAC and SAGA complexes was not altered by the absence of XPC in XP-C^{DEL} cells (Supplementary Figure 4A).

To determine which complex was recruited with XPC at promoters of XPC-dependent genes, we performed ChIP analysis on *CCND1* and *DAPK1*. As expected, neither ZZZ3 (ATAC subunit) nor TRRAP (SAGA subunit) was detected at the promoter of the XPC-negatively regulated *CCND1* gene in XP-C^{DEL}, XP-C^{MUT}, or XP-C^{WT} cells in which KAT2A was not recruited (Fig. 4d, left panel). Interestingly, we only observed enrichment of ZZZ3 and KAT2A at the *DAPK1* promoter upon ATRA treatment in XP-C^{WT} and XP-C^{MUT} cells, while neither TRRAP nor KAT2B was detected (Figs. 4d, right panel, and 3d, also Supplementary Figure 4B for supplemental genes). The detection of ZZZ3 at the *DAPK1* promoter was abolished in XP-C^{DEL} cells (Fig. 4d, also Supplementary Figure 4B for supplemental genes). In contrast, TRRAP and ZZZ3 were detected at SAGA-targeted *RBBP5* and ATAC-targeted *SNC16* in XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells, respectively (Supplementary Figure 4C)²³.

We also analyzed by ChIP the SAGA vs. ATAC complex recruitment at the *RAR β* promoter in shCtrl, shXPC, and shXPA cells. While only ZZZ3 and KAT2A were readily recruited, no TRRAP could be observed at this promoter upon ATRA treatment in shCtrl or shXPA cells. ZZZ3 and KAT2A accumulation was lost in shXPC cells, indicating that the

recruitment of the ATAC complex required the presence of XPC (Supplementary Figure 4D).

Altogether, our findings indicated that XPC not only interacts with both ATAC and SAGA but also plays an active role in transcription via the specific recruitment of the ATAC complex to promoters upon transactivation.

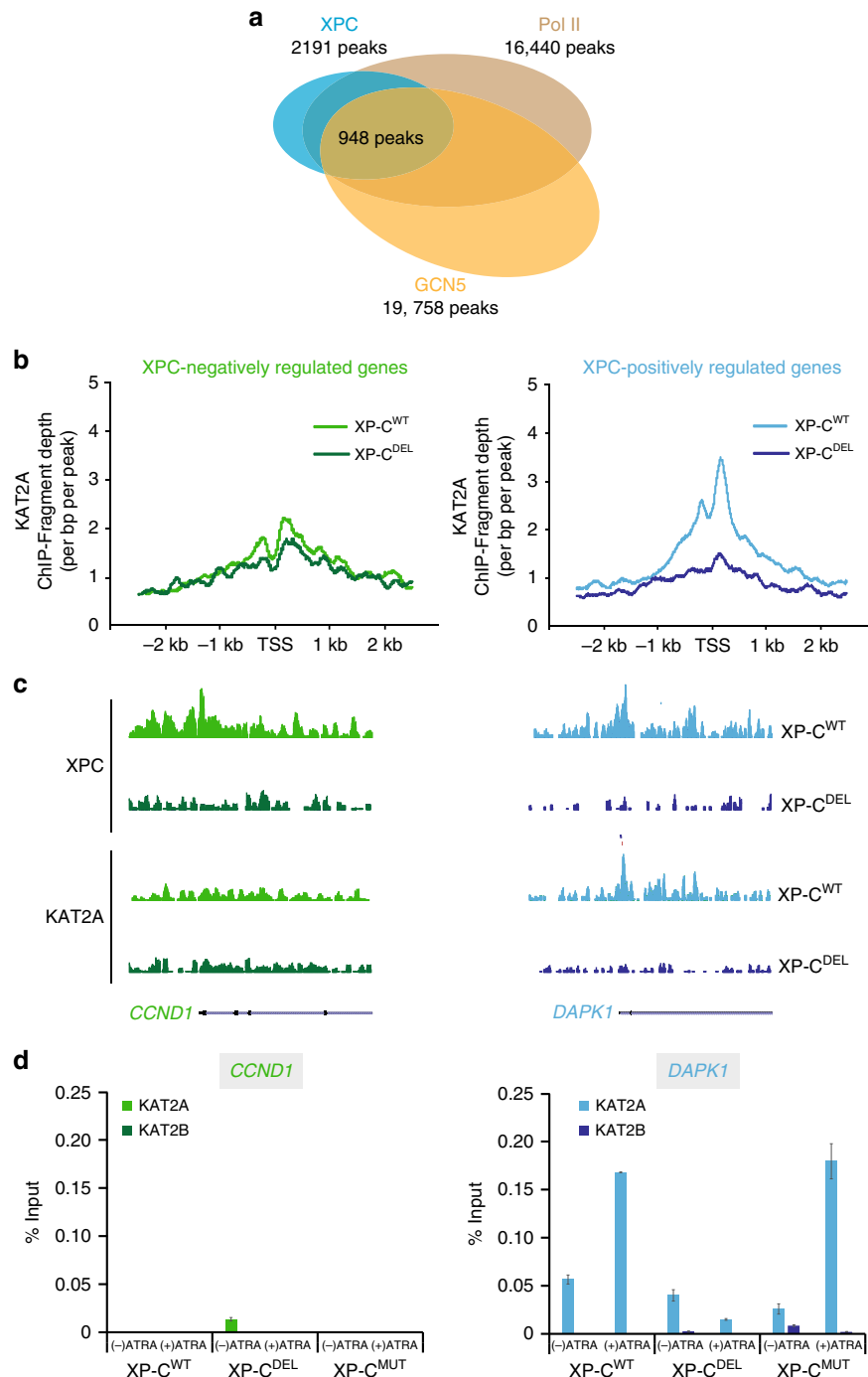


Fig. 3 Association of XPC-bound promoters with KAT2A. **a** Overlapping of peaks for Pol II and XPC with KAT2A peaks in XP-C^{WT} cells after ATRA induction. These peaks correspond to recurrent peaks found in three independent ChIP-seq experiments. **b** Diagrams representing the fragment depth of KAT2A ChIP-seq experiment for XPC-negatively regulated (left panels) and XPC-positively regulated (right panels) genes, as they were previously determined in XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells. **c** UCSC genome browser for XPC and KAT2A at *CCND1* and *DAPK1* promoters as XPC-negatively regulated and XPC-positively regulated genes, respectively. **d** Occupancy of KAT2B and KAT2A monitored by ChIP at *CCND1* and *DAPK1* promoters as XPC-negatively regulated and XPC-positively regulated genes. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments

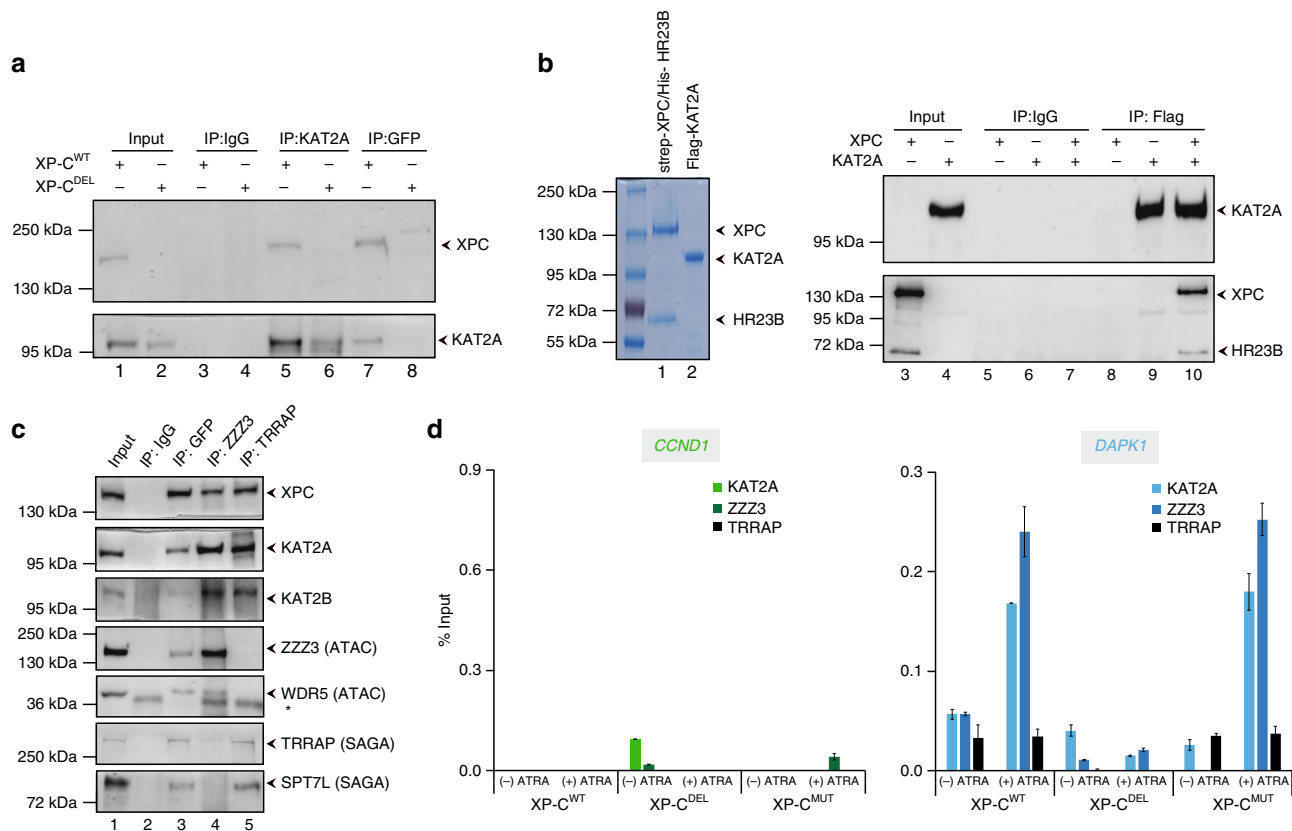


Fig. 4 XPC interacts directly with KAT2A. **a** Immunoprecipitation performed on nuclear extract of untreated XP-C^{WT} or XP-C^{DEL} fibroblasts with antibody against GFP, KAT2A, or IgG. **b** Blue staining of recombinant Flag-KAT2A and duplex strep-XPC/His-HR23B (left panel). In vitro co-immunoprecipitation assay performed by antibodies against Flag tag and IgG with the recombinant protein Flag-KAT2A and the duplex strep-XPC/His-HR23B. **c** Immunoprecipitation performed on nuclear extract of untreated XP-C^{WT} fibroblasts with antibody against TRRAP, GFP, or IgG. Western blot was revealed with antibodies directed against GFP, KAT2A, KAT2B, ZZZ3, WDR5 (ATAC), TRRAP, and SPT7L (SAGA). **d** ChIP experiment monitoring the recruitment of KAT2B, KAT2A, ZZZ3, and TRRAP at *CCND1* and *DAPK1* promoters, before and after ATRA treatment. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments

XPC is recruited to E2F1-dependent genes after ATRA treatment. In the above results, we established that XPC is present in the ATAC complex via KAT2A, triggering active histone PTMs at the promoter of a subset of genes. We then subsequently searched for specific DNA motifs associated with XPC/ATAC-bound promoters that could explain the recruitment of XPC to these promoters. A GREAT analysis indicated enrichment of E2F1 transcription factor-binding motif at 89% of the 283 promoters of XPC-positively regulated genes, including *DAPK1* and *RARβ2* (Supplementary Figure 5A). Interestingly, the motif was rarely detected at XPC-negatively regulated genes. We next performed a meta-analysis using E2F1 ChIP-seq data from the ENCODE project by selecting only XPC-positively or -negatively regulated genes, and observed a stronger E2F1 enrichment around promoters for XPC-positively regulated genes (Fig. 5a). ChIP assays on *CCND1* and *DAPK1* promoters showed the recruitment of E2F1 after ATRA treatment only at the XPC-positively regulated genes in XP-C^{WT} cells (Fig. 5b and also S5B for additional genes). Moreover, the enrichment was lost in the absence of XPC in XP-C^{DEL} cells while it was still detected in XP-C^{MUT} cells (Fig. 5b and also Supplementary Figure 5B for additional genes).

We next assessed the existence of a complex containing XPC, KAT2A, and E2F1, by carrying out E2F1-immunoprecipitation experiments on nuclear extracts from untreated XP-C^{WT} cells. In these conditions, KAT2A and XPC co-precipitated a complex containing E2F1 (Fig. 5c). We thus investigated whether the detection of the complex, including XPC/hHR23B, KAT2A, and

E2F1 reflected direct interactions between these proteins by using recombinant purified proteins (Fig. 5d). We observed that immunoprecipitation of KAT2A yielded in co-precipitated XPC alone as expected or E2F1 alone as previously showed²⁴ (Fig. 5d, lanes 10 and 12) and that a complex containing recombinant and purified XPC/hHR23B, KAT2A, and E2F1 was detected when they were incubated together (Fig. 5d, lane 13).

Our data showed that the presence of responsive element for E2F1 defines the XPC-positively regulated genes and that XPC/hHR23B, E2F1, and KAT2A can interact to form a tripartite complex.

XPC and E2F1 mediate the recruitment of KAT2A to XPC-regulated genes. We next measured the impact of E2F1 and KAT2A on XPC-regulated gene expression and protein recruitment at promoters, by transiently transfecting XP-C^{WT} cells with siRNA targeting either KAT2A or E2F1 (Fig. 6a). Upon ATRA treatment, the silencing of KAT2A and E2F1 did not disturb the induction of *CCND1*, while *DAPK1* transactivation was abolished (Fig. 6b). ChIP analysis of the KAT2A and E2F1-independent *CCND1* promoter showed that their absence did not affect the recruitment of Pol II and XPC or the deposition of H3K9ac upon transcription (Fig. 6c, e, left panel). The silencing of KAT2A did not lead to significant changes in Pol II, XPC, and E2F1 recruitment at the *DAPK1* promoter (Fig. 6c, d, right panel). However, the recruitment of Pol II, XPC, and KAT2A decreased upon depletion of E2F1 (Fig. 6c, d, right panel). Both si KAT2A

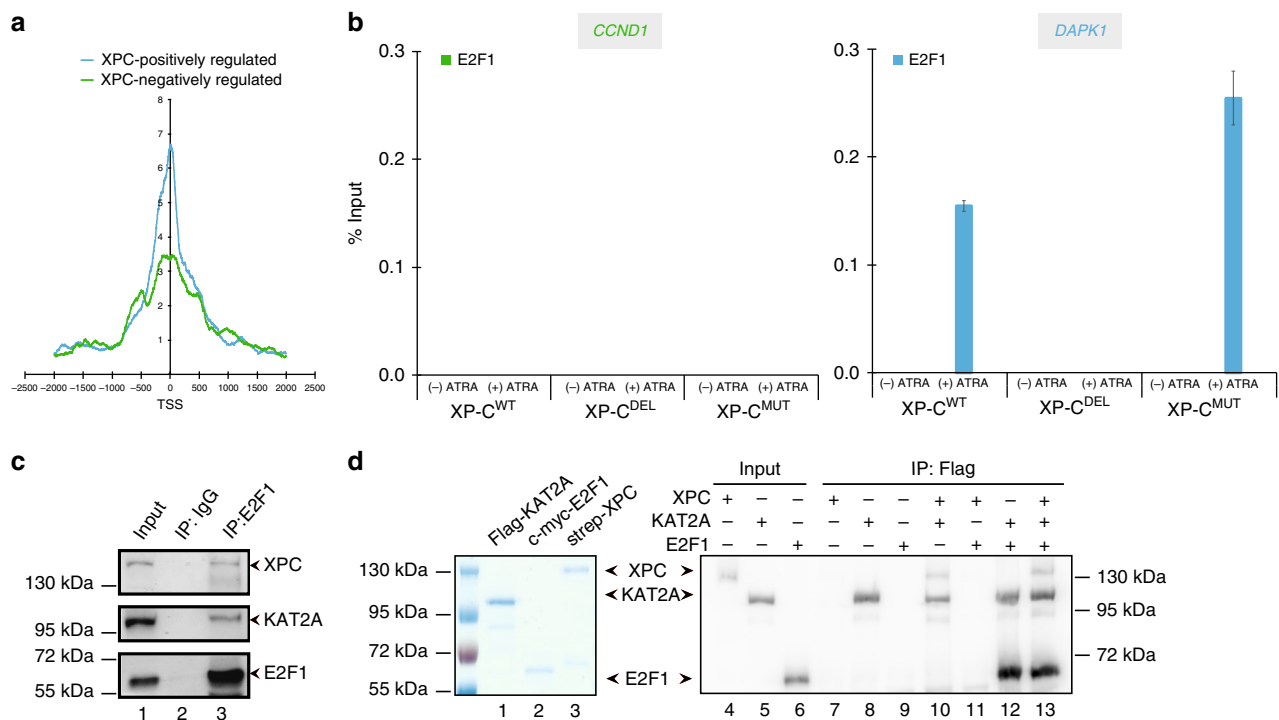


Fig. 5 Ménage-à-trois between XPC, KAT2A, and E2F1. **a** Diagrams representing the fragment depth of E2F1 from ENCODE ChIP-seq data for XPC-negatively regulated (green) and XPC-positively regulated (blue) genes, as they were previously determined in XP-C^{WT} and XP-C^{DEL}. **b** ChIP experiment investigating the occupancy of E2F1 at *CCND1* and *DAPK1* promoters, with or without ATRA treatment. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments. **c** Immunoprecipitation performed on nuclear extracts from untreated XP-C^{WT} fibroblasts with antibody against E2F1 or IgG. Western blot was revealed with antibodies directed against E2F1, XPC, and KAT2A. **d** Left panel; blue staining of recombinant Flag-KAT2A, duplex Strep-XPC/His-HR23B, and c-myc-E2F1. Right panel; in vitro co-immunoprecipitation assay performed by antibodies against Flag tag with the recombinant protein Flag-KAT2A, the duplex Strep-XPC/His-HR23B, and c-myc-E2F1

and si E2F1 blocked the acetylation of H3K9 at the *DAPK1* promoter (Fig. 6e). Similar results were obtained with *RARβ2* (Supplementary Figure 6).

Together, these results showed that XPC, E2F1, and KAT2A are necessary for the appropriate acetylation of H3K9 at the promoter of XPC-positively regulated genes. Moreover, XPC and E2F1 were mutually necessary for their recruitment and drove KAT2A recruitment upon transactivation.

Discussion

The present work uncovers the genomic distribution and the transcriptional impact of the DNA repair factor XPC. Since XPC is not involved in TC-NER²⁵ and our study is performed in the absence of any exogenous genomic stress, the impact of XPC in modulating the transcriptional cell program is independent from its role in DNA repair. In the absence of damage and upon ATRA treatment the lesion sensor XPC was mainly localized around TSSs, colocalizing with Pol II and regulating positively or negatively around 500 genes. RNA-seq analysis also showed that several hundred genes were deregulated in XPC-depleted cells in the absence of ATRA treatment (Supplementary Figure 7A-B). The comparison between untreated and ATRA-treated conditions in both cells indicated a weak overlap between the different sets of deregulated genes (Supplementary Figure 7C and Supplementary Data 5). The expression of two gene models used in this study was unaffected by the absence of XPC in untreated cells, arguing that XPC only affects their transcription in the complex transcriptional context that represent RAR-dependent transactivation. In accordance to the GO analysis, our results describe phenomenon related to ATRA treatment but the data from

untreated cells also showed that our observations are not exclusive to this stimulus. Further experiments will help to characterize the global relevance of the transcriptional role of XPC in transcription and its impact on the pathophysiology of XP-C patients.

For the purpose of clarity and accuracy, we deliberately focused our analysis on ATRA-dependent genes affected by the absence of XPC (representing 46% of all XPC peaks) although our preliminary data suggested the presence of XPC on other DNA regulatory regions such as enhancers, a phenomenon previously shown for pluripotency regulating genes in ES cells¹⁵.

The consequences of XPC depletion measured in fibroblasts derived from XP-C patients allowed us to identify, at the genomic scale, its importance for the enrichment of Pol II at TSSs and its specific involvement in the proper distribution of histone PTMs, including H3K9ac and H3K4me3 marks. Importantly, the analysis of shXPA cells indicated that the enrichment of the histone PTMs upon transcription was specifically related to the presence of XPC.

Using ex vivo and in vitro approaches, we demonstrated that XPC interacted with KAT2A and mediated its recruitment and the related H3K9ac deposition at promoter of XPC-positively regulated genes. The co-recruitment of XPC and E2F1 to promoter leads to the recruitment of KAT2A that is present in the SAGA and ATAC coactivator complexes. SAGA and ATAC also contain the close paralog of KAT2A, KAT2B, but only the KAT2A version of these complexes contains XPC. Furthermore, we observed that only ATAC was found to co-localize with XPC upon ATRA treatment so that the interaction of XPC with SAGA and its molecular role remains elusive and requires further investigation. We hypothesize that the SAGA-XPC assembly may target promoters regulated by other specific transcription factors

and/or by different signaling cascades since ATAC and SAGA are recruited to different stress-induced genes promoters²³.

Experiments performed in cells depleted in XPA show that XPC was still recruited to the pre-initiation complex (PIC) while depletion of XPC impaired the recruitment of XPA, indicating that XPC was the first NER factor to be recruited to the PIC. We

next sought to identify the signals that triggered the recruitment of XPC to a subset of genes and identified the consensus binding site of E2F1 at 89% of XPC-activated genes. Using ChIP, we demonstrated that E2F1 and XPC mutually synergized their binding to promoters and consequently contribute both to the recruitment of KAT2A through direct interactions. XPC is then

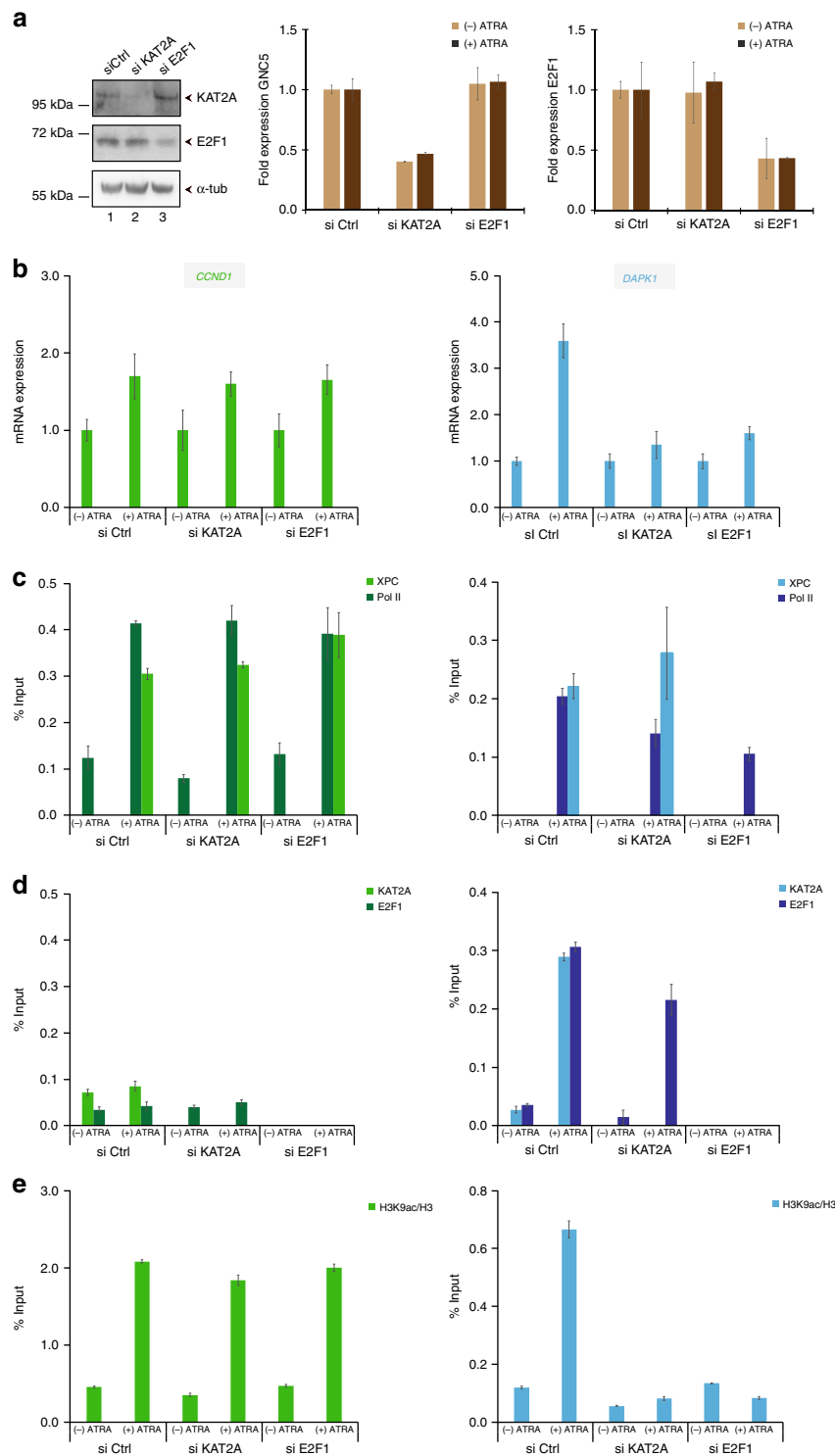


Fig. 6 XPC and E2F1 are mutually necessary for their recruitment and co-operate to recruit KAT2A at promoters upon transcription. **a** Expression of KAT2A and E2F1 in XP-C^{WT} cells treated with siRNA targeting KAT2A (si KAT2A), E2F1 (si E2F1), or scrambled siRNA (si Ctrl) monitored by western blot (left panel) and qPCR (middle and left panels). **b** Relative mRNA expression of *CCND1* and *DAPK1*, before and after ATRA treatment in si Ctrl, si KAT2A, and si E2F1 XP-C^{WT} cells. **c, d, e** Corresponding recruitment of Pol II, XPC (**c**), KAT2A, and E2F1 (**d**) as well as histone H3K9ac/H3 (**e**) at *CCND1* and *DAPK1* promoters monitored by ChIP. All the error bars represent the standard deviation of three independent experiments

functioning as a bridge between E2F1 and ATAC, increasing the recruitment of the HAT to XPC-activated genes. As thus, XPC could be considered as a cofactor of mRNA expression in mammalian cells, linking a transcription factor (E2F1) to a coactivator (ATAC). This model also implies that all the mutations affecting XP-C patients are not affecting its transcription function, which is what we observed in XP-C^{MUT} cells that harbor a punctual mutation (XPC p.Pro334His) affecting XPC NER function without impact on RAR-dependent gene activation. In agreement with this observation, we didn't observe impact of XPC p.Pro334His mutation on XPC/KAT2A interaction.

In addition to E2F1, we cannot exclude the role of additional players for the proper recruitment of XPC to TSS, similarly to TATA-binding protein associated factors (TAFs) that were shown to interact with XPE^{26,27}. Interestingly, among the genes positively regulated by XPC, *SET1* encoding one methyl transferase depositing H3K4me3 mark has been identified. Concomitantly, a reduced expression of SET1 and a reduced recruitment of the protein at genes activated by XPC were observed in XP-C^{DEL} cells, suggesting an indirect effect of XPC on the H3K4me3 mark (Supplementary Figure 8).

Based on our genome-wide analysis, a large proportion of genes regulated by XPC are related to chromatin and present oncogenic and immunologic signatures. XPC seems to be related to the immune response as demonstrated in two recent studies. First, it has been demonstrated that XPC, through DNA damage, can induce the expression of cytokine like interleukin-6 possessing pro-tumorigenic effects in lung fibroblasts²⁸. Also, multi-omic analyses aiming to identify factors and pathways implicated in the cellular response to UV-induced DNA damage have recently shown connections with the immune system²⁹. In this study, the analysis of several IFN mRNA expression in XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells in absence of ATRA treatment indicated higher expressions of IFN beta, gamma, and alpha in cells XPC-depleted that were unrelated to the RAR-dependent pathway (Supplementary Figure 9). Although the dual molecular involvement of NER factors in transcription and DNA repair is now well established, the impact of their deregulation in the pathological context is still elusive, including for the immune response of XP patients. What is more, our data suggest an additional link with transcriptional deficiencies. *DAPK1*, analyzed in this study, is particularly interesting as it acts as an inhibitor of RIG-I, signaling the necessity to induce the production of type I IFN³⁰ and as a tumor suppressor, downregulated in multiple cancer types³¹.

Our comparison of fibroblasts derived from two XP-C patients XP-C^{DEL} and XP-C^{MUT}, bearing XPC p.Arg579* and XPC p.Pro334His mutations, respectively, presenting severe and mild clinical features, respectively, shows deregulation of gene expression only in XP-C^{DEL} cells while GG-NER is impaired in the two cell lines^{17,18}. In XP-C^{DEL} cells indeed, the absence of XPC impairs the DNA damage recognition step while in XP-C^{MUT} cells, the XPC variant can still bind the damaged sites, recruits TFIIH but impedes the stimulation of the TFIIH XPB subunit ATPase activity, leading to a delayed arrival of XPA¹⁷. Our observations suggest a correlation between transcriptional default and XP severity although more XP-C cases need to be tested to support this hypothesis. However, the pathological implication of the deregulation of the XPC transcriptional roles remains questioning. Indeed, although XPC has been identified in a transcriptional coactivator complex containing Oct4/Sox2 that maintains pluripotency of stem cells¹⁵, it has to be noticed that XPC^{-/-} mice do not show developmental defects³². Also, ablation of the C-terminal region of XPC gene abrogating the interaction sites of XPC with known partners RAD23 and CETN2 has minimal impact on gene expression or pluripotency to contribute

to chimeric embryos³³. The identification of genes and the pathways regulated by XPC will give a more global view of the role of XPC as a Pol II cofactor and will help to identify relevant markers for an early and specific diagnosis, and to anticipate/predict the cancer risk among the different symptoms. In conclusion, we have uncovered a role for XPC as a regulator of chromatin marks necessary for transcription, redefining the molecular etiology of XP.

Methods

Cell culture. HeLa Silencix cells (Tebu-Bio), including shCtrl, shXPC, and shXPA cells, MRC-5 fibroblasts (ATCC # CCL-171), XP-C patient-derived fibroblasts GM14867 (XP-C^{DEL}) and GM02096 (XP-C^{MUT}), and rescued XP-C (XP-C^{WT})^{17,19} (Coriell Institute) were used and cultured in appropriate medium. Twelve hours before ligand treatment, cells were incubated with phenol red-free medium containing charcoal-treated fetal calf serum and 40 mg/ml gentamycin. Cells were treated with 10 μ M ATRA (MP).

Reverse transcription and quantitative PCR. Total RNA was isolated from several cell lines using a GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma) and reverse transcribed with SuperScript IV reverse transcriptase (Invitrogen). The quantitative PCR (qPCR) was done using the Lightcycler 480 (Roche). The primer sequences for the different genes used in qPCR are indicated in Supplementary Data 3. The mRNA expression of the different analyzed genes represents the ratio between values obtained from treated and untreated cells normalized with the housekeeping *GAPDH* mRNA.

Chromatin immunoprecipitation. Cells were crosslinked at room temperature for 10 min with 1% formaldehyde. Chromatin was prepared and sonicated at 4 °C for 30 min using sonicator Q800R (Qsonica) as previously described⁶. Samples were immunoprecipitated with antibodies at 4 °C overnight, and protein G-coated Dynabeads (Invitrogen) were added, incubated for 4 h at 4 °C, and sequentially washed. Protein-DNA complexes were eluted and decrosslinked. DNA fragments were purified using QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) and analyzed by qPCR using a set of primers indicated in Supplementary Data 3.

RNA-seq analysis. Total RNA from XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells were extracted before or 6 h after ATRA treatment (10 μ M) using TRI REAGENT (MRC) and purified by phenol-chloroform extraction. Libraries were prepared with TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit following guide instruction and subsequently proceed on an Illumina HiSeq 4000 as single-end 50 base reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads were mapped onto the hg19 assembly of the human genome. Reads count was performed with HOMER v4.8.3(65) and expression was estimated with EdgeR. Genome ontology was performed with The Database for Annotation and Integrated Discovery v6.7 (<https://david.ncifcrf.gov>).

ChIP-seq analysis. Purified DNA fragments analyzed by ChIP-seq were prepared by using the ChIP-IT High Sensitivity Kit (Active Motif) and the related antibodies. ChIP-seq was performed on an Illumina HiSeq 2500 as single-end 50 base reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 1.17.20 and CASAVA 1.8.2. Reads were mapped onto the hg19 assembly of the human genome. Peak detection was performed using MACS (<http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/>) under settings where the input fraction was used as negative control. Peaks detected were annotated using HOMER (<http://biowhat.ucsd.edu/homer/ngs/annotation.html>) as well as TSS protein enrichment comparison. Quantitative comparison of Pol II gene body enrichment was performed using seqMINER (<http://bips.u-strasbg.fr/seqminer/>). As reference coordinates, we used the MACS-determined peaks or the annotated TSS/TTS of human genes as defined by RefSeq database. Sequence enrichment was performed using RSAT (<http://rsat.sb-roscoff.fr>) with MACS-determined peaks as reference.

Plasmids and purification of recombinant proteins. PCR products for the entire coding sequence XPC was cloned into pDONOR-207 vector using the Gateway system (Invitrogen) and later cloned in bicistronic plasmid VEAP5317 with hHR23B kindly obtained from A. Poterszman. For recombinant Flag-GCN5 expression in Sf9 cells, the corresponding vector pSK227-KAT2A was kindly provided by L. Tora³⁴. PCR product for the entire coding sequence E2F1 was also cloned into pDONOR-207 vector and later sub-cloned in pAC8 vector. Sf9 cells were infected with baculoviruses expressing a FLAG-tagged KAT2A, Strep tactin-tagged XPC/His-tagged hHR23B, or c-myc-tagged E2F1, and the harvested recombinant proteins were purified as previously described³⁵.

siRNA transfection. ON-TARGET plus smart pool siRNA control or targeting human KAT2A and E2F1 were purchased from Thermo Scientific and transfected

in XP-C^{WT} cells at a final concentration of 100 nM using X-tremeGENE siRNA transfection reagent (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's protocol.

Co-immunoprecipitation. For *in vivo* co-IPs, nuclear extracts from untreated XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells were prepared as previously described³⁶. After GFP-trap or KAT2A, ZZZ3, or TRRAP immunoprecipitation using the appropriate antibodies conjugated to protein G-coated Dynabeads (Invitrogen), followed by extensive washes, was carried out and the different co-precipitated proteins were detected using specific antibodies after immunoblotting.

For *in vitro* co-IPs, recombinant purified Flag-KAT2A was then incubated with recombinant purified Strep-XPC/His-hHR23B and/or c-myc E2F1 before Flag immunoprecipitation was carried out. After washes, bound proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and detected by western blot.

Antibodies. Antibodies toward RBP1 (RNA Pol II) (7C2), RAR (9A6), TBP (3G3), XPA (1E11), KAT2A (5GC-2A6), XPG (1B5), ZZZ3 (2616), XPC (2076), and TRRAP (1B3) were produced at the IGBMC. CDK7 (C-19), E2F1 (C-20), and XPC (D-18) antibodies were purchased by Santa-Cruz Biotechnology. H3k4me3 (ab1012), KAT2B (ab12188), and α -tubulin (ab15246) antibodies were purchased by Abcam and WDR5 (07-706) antibody from Upstate. Antibodies directed toward KAT2A (A4013) were obtained from Epigentek while those against Spt7L (A302-803A) and hSET1 (A300-803A) from Bethyl. Antibodies against H3K9ac (61251) and H3 (61475) were from Active Motif. Antibodies toward GFP (TP401) and M2-Flag (F1804) were purchased by Torrey Pines Biolabs and Sigma-Aldrich, respectively. For immunoblot, the concerned antibodies were diluted at 1–1000 while 5–10 μ g of antibodies were used for ChIP experiments.

Data availability. All relevant data are available from the authors upon request. The accession numbers for the sequencing data reported in this paper are <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?acc=SRP148864>.

Received: 19 January 2018 Accepted: 25 May 2018

Published online: 04 July 2018

References

- Mellon, I., Spivak, G. & Hanawalt, P. C. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* **51**, 241–249 (1987).
- Schaeffer, L. et al. DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* **260**, 58–63 (1993).
- Feaver, W. J. et al. Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell* **75**, 1379–1387 (1993).
- Barreto, G. et al. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* **445**, 671–675 (2007).
- Schmitz, K. M. et al. TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol. Cell* **33**, 344–353 (2009).
- Le May, N. et al. NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol. Cell* **38**, 54–66 (2010).
- Cleaver, J. E. Splitting hairs—discovery of a new DNA repair and transcription factor for the human disease trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst.)* **4**, 285–287 (2005).
- Bootsma, D., Kraemer, K.H., Cleaver, J.E. & Hoeijmakers, J.H.J. in *The Genetic Basis of Human Cancer* 2nd edn (eds Vogelstein, B. & Kinzler, K.W.) 211–237 (McGraw-Hill, New York, 2002).
- Compe, E. & Egly, J. M. Nucleotide excision repair and transcriptional regulation: TFIIH and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 265–290 (2016).
- Sugasawa, K. Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutat. Res.* **685**, 29–37 (2010).
- Guo, R., Chen, J., Mitchell, D. L. & Johnson, D. G. GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1390–1397 (2011).
- Takedachi, A., Saijo, M. & Tanaka, K. DDB2 complex-mediated ubiquitylation around DNA damage is oppositely regulated by XPC and Ku and contributes to the recruitment of XPA. *Mol. Cell Biol.* **30**, 2708–2723 (2010).
- Luijsterburg, M. S. et al. DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J. Cell Biol.* **197**, 267–281 (2012).
- Le May, N., Fradin, D., Iltis, L., Bougneres, P. & Egly, J. M. XPG and XPF endonucleases trigger chromatin looping and DNA demethylation for accurate expression of activated genes. *Mol. Cell* **47**, 622–632 (2012).
- Fong, Y. W. et al. A DNA repair complex functions as an Oct4/Sox2 coactivator in embryonic stem cells. *Cell* **147**, 120–131 (2011).
- Cattoglio, C. et al. Functional and mechanistic studies of XPC DNA-repair complex as transcriptional coactivator in embryonic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, E2317–E2326 (2015).
- Bernardes de Jesus, B. M., BJORAS, M., COIN, F. & Egly, J. M. Dissection of the molecular defects caused by pathogenic mutations in the DNA repair factor XPC. *Mol. Cell Biol.* **28**, 7225–7235 (2008).
- Gozukara, E. M. et al. A stop codon in xeroderma pigmentosum group C families in Turkey and Italy: molecular genetic evidence for a common ancestor. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 197–204 (2001).
- Nishi, R. et al. UV-DDB-dependent regulation of nucleotide excision repair kinetics in living cells. *DNA Repair (Amst.)* **8**, 767–776 (2009).
- Nagy, Z. & Tora, L. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**, 5341–5357 (2007).
- Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. & Nakatani, Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319–324 (1996).
- Wang, L. & Dent, S. Y. Functions of SAGA in development and disease. *Epigenomics* **6**, 329–339 (2014).
- Krebs, A. R., Karmodiya, K., Lindahl-Allen, M., Struhl, K. & Tora, L. SAGA and ATAC histone acetyl transferase complexes regulate distinct sets of genes and ATAC defines a class of p300-independent enhancers. *Mol. Cell* **44**, 410–423 (2011).
- Lang, S. E., McMahon, S. B., Cole, M. D. & Hearing, P. E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors. *J. Biol. Chem.* **276**, 32627–32634 (2001).
- Mu, D. & Sancar, A. Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans. *J. Biol. Chem.* **272**, 7570–7573 (1997).
- Kamileri, I. et al. Defective transcription initiation causes postnatal growth failure in a mouse model of nucleotide excision repair (NER) progeria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 2995–3000 (2012).
- Chatzinikolaou, G. et al. ERCC1-XPF cooperates with CTCF and cohesin to facilitate the developmental silencing of imprinted genes. *Nat. Cell Biol.* **19**, 421–432 (2017).
- Schreck, I. et al. The nucleotide excision repair protein XPC is essential for bulky DNA adducts to promote interleukin-6 expression via the activation of p38-SAPK. *Oncogene* **35**, 908–918 (2016).
- Boeing, S. et al. Multiomic analysis of the UV-induced DNA damage response. *Cell Rep.* **15**, 1597–1610 (2016).
- Willemsen, J. et al. Phosphorylation-dependent feedback inhibition of RIG-I by DAPK1 identified by kinome-wide siRNA screening. *Mol. Cell* **65**, 403–415. e8 (2017).
- Kissil, J. L. et al. DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* **15**, 403–407 (1997).
- Sands, A. T., Abuin, A., Sanchez, A., Conti, C. J. & Bradley, A. High susceptibility to ultraviolet-induced carcinogenesis in mice lacking XPC. *Nature* **377**, 162–165 (1995).
- Ito, S., Yamane, M., Ohtsuka, S. & Niwa, H. The C-terminal region of Xpc is dispensable for the transcriptional activity of Oct3/4 in mouse embryonic stem cells. *FEBS Lett.* **588**, 1128–1135 (2014).
- Demeny, M. A. et al. Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes. *PLoS ONE* **2**, e316 (2007).
- Singh, A., Compe, E., Le May, N. & Egly, J. M. TFIIH subunit alterations causing xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy specifically disturb several steps during transcription. *Am. J. Hum. Genet.* **96**, 194–207 (2015).
- Nagy, Z. et al. The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 611–628 (2010).

Acknowledgements

We are grateful to A. Poterszman and L. Tora (IGBMC) for the VEAP5317 and KAT2A constructs, respectively, to members of our team, and to Didier Devys (IGBMC) for fruitful discussion. Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the “France Génomique” consortium (ANR-10-INBS-0009). This study was supported by l'Association de la Recherche contre le Cancer (ARC no. SL220130607082) and the National Research Foundation of Korea for International Collaboration. This study was supported by the Ligue contre le cancer (CCIR-GE 2015). This study was supported by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02. B.B. was supported by the fondation pour la recherche médicale (FDT20160736467). M.S. was supported by le prix d'encouragement à la recherche de la province Sud (Nouvelle Calédonie).

Author contributions

B.B., I.I., M.S., Z.N., A.L. A.C., M.B., and N.L.M. conducted experiments and analyzed data. N.L.M., F.C., and J.-M.E., conceived the project, supervised the research, and wrote the manuscript with input and editing from all the authors.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05010-0>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Publication 2

XPC triggers acetylation of H2A.Z by KAT2A to recruit the chromatin remodeler BRD2 and initiate retinoic-acid dependant gene expression.

Semer M., Bidon B., Larnicol A., Coin F. & Le May N.

Finalisation de l'article en cours

Résumé :

The DNA damage sensor XPC is involved in Xeroderma pigmentosum group-C (XP-C), a complex genetic disorder with predisposition to skin cancer. Recently, a transcriptional role has been assigned to XPC but the molecular details of this unexpected function remain unknown. Here, using mass spectrometry and comparative genome-wide approach we demonstrated that XPC interacts with H2A.Z and co-localizes with its acetylated form (acH2A.Z) at a subset of active retinoic-acid (RA) dependent promoters. Depletion of XPC removes acH2A.Z from active promoters without impacting deposition of H2A.Z. We further demonstrate that XPC recruits the histone acetyl transferase (HAT) KAT2A to active promoters to acetylate H2A.Z. In vitro, we show that KAT2A acetylates H2A.Z possibly on K4, K7, K11 and K13 residues. We further demonstrate that acH2A.Z at XPC-dependent promoters triggers the recruitment of the chromatin remodeler BRD2, essential to initiate gene expression. Altogether, our results establish XPC as a molecular bridge between histone variants and coactivators to remodel chromatin and initiate class II gene expression.

**XPC triggers acetylation of H2A.Z by KAT2A to recruit the
chromatin remodeler BRD2 and initiate retinoic-acid dependent
gene expression**

Semer M.^{1,2,3,4}, Bidon B.^{1,2,3,4}, Larnicol A.^{1,2,3,4}, Coin F.^{1,2,3,4*} & Le May N.^{1,2,3,4*}

¹IGBMC, Department of Functional Genomics and Cancer, CNRS/INSERM/University of
Strasbourg, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, C.U. Strasbourg, France

²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, 67404 Illkirch, France

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U964, 67404 Illkirch, France

⁴Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

*Correspondence: nlemay@igbmc.fr, fredr@igbmc.fr

Key words: XPC, transcription, GCN5, H2A.Z, H2A.Zac, BRD2, *Xeroderma
Pigmentosum*.

INTRODUCTION

Expression of protein-coding genes is tightly regulated and involves combinatorial use of more than 200 proteins required for the synthesis of a single messenger RNA by the RNA Polymerase II (RNAPII) ¹. Besides RNAPII, the transcription of class II genes requires general transcription factors (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF and TFIIH) whose activities are controlled by co-activators and co-repressors, DNA binding transcription factors (such as nuclear receptors, NR) and proteins that trigger chromatin remodelling events including histone post-translational modifications (PTMs), active DNA demethylation, chromatin rearrangements or histone incorporation/eviction. In the recent years, investigating the molecular mechanisms regulating NR-dependent gene transactivation was central in identifying new players harbouring more broad and crucial roles in general transcription.

Among the newly identified transcription players, a growing list of DNA repair proteins and complexes were shown to participate to chromatin remodeling, a key step for gene expression ². For instance, PARP-1 is a major actor of DNA integrity maintenance but was also shown to be required for NR-mediated transcription processes, including retinoic acid (RAR) and estradiol receptors (ER) ^{3,4}. The enzyme has been found associated with actively-transcribed genes, where it is required for local changes of chromatin architecture through double stranded DNA breaks specifically generated at the promoter region by the Topoisomerase II beta enzyme (TopoIIB) ⁴. Similarly, the Base Excision Repair (BER) enzyme thymine DNA glycosylase (TDG) can potentiate transcription by acting as a scaffold to bridge the co-activator CBP/p300 to RAR/RXR ^{5,6}. Finally, Nucleotide Excision Repair (NER) factors have been also associated to the regulation of RAR-target genes. Indeed, we

have demonstrated that the NER factors XPC, CSB, XPA, RPA, XPG and ERCC1-XPF were recruited to the pre-initiation complex (PIC) in order to influence locally histones post-translational modifications (PTMs) and DNA demethylation around the promoter ^{7,8}. More specifically, XPG and XPF participated in the induction of DNA breaks and DNA demethylation that are necessary for the chromatin rearrangement and gene looping at the RARB2 gene ⁸. More recently, the NER DNA damage sensor XPC has been shown to form a complex with Oct4/Sox2 and to function as a coactivator for active DNA demethylation in ES and iPS cells ^{9,10}. In agreement with a transcriptional role for XPC, we have recently identified a complex including XPC, transcription factor E2F1 and the histone acetyl-transferase (HAT) KAT2A that is specifically recruited to a subset of RAR-dependent promoters, conditioning the presence of the ATAC complex and the deposition of the H3K9ac mark ¹¹. The involvement of XPC in epigenetic regulation upon transcription is then well established. However, the molecular details of this new function remain unclear and the identification of the XPC transcriptional partners in an unbiased manner, is crucial to decipher the role of this NER factor in gene expression.

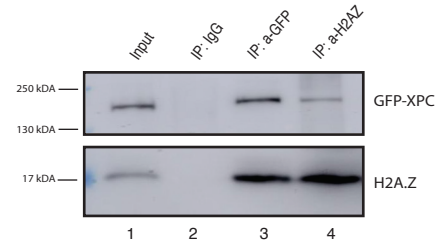
In the present study, we have isolated and identified by mass spectrometry XPC partners from human fibroblasts. We showed that XPC can directly interact with histone variant H2A.Z and participates in the deposition of acetylated H2A.Z (acH2A.Z). Our biochemical assays coupled to genome-wide chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq) approaches indicated that XPC recruits KAT2A, a histone acetyl transferase (HAT) that unexpectedly acetylates H2A.Z at a subset of RAR-target-genes. Finally, XPC-dependent acetylation of H2A.Z drives the recruitment of the chromatin remodeler BRD2 triggering expression

of XPC-regulated genes. Altogether, our results establish XPC as a molecular bridge between histone variant and coactivators to remodel chromatin and initiate class II gene expression.

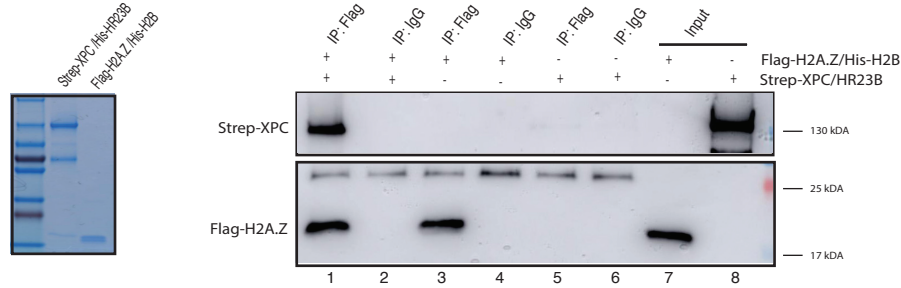
A.

Accession	Description	Σ Coverage	MW [kDa]
O00268	Transcription initiation factor TFIID subunit (TAF4)	3,23	110,0
Q01831	DNA repair protein complementing XP-C (XPC)	2,87	105,9
Q92804	TATA-binding protein-associated factor 2N (TAF15)	3,89	61,8
P41208	Centrin 2 (Cent 2)	17,44	19,7
Q9BZ95	Histone-lysine N-methyltransferase NSD3 (NSD3)	2,71	161,5
P55199	RNA polymerase II elongation factor ELL (ELL)	3,54	68,2
P54727	UV excision repair protein RAD23 (HR23B)	4,16	43,1
P0C0S5	Histone H2A.Z (H2AZ)	14,84	13,5

B.



C.



D.

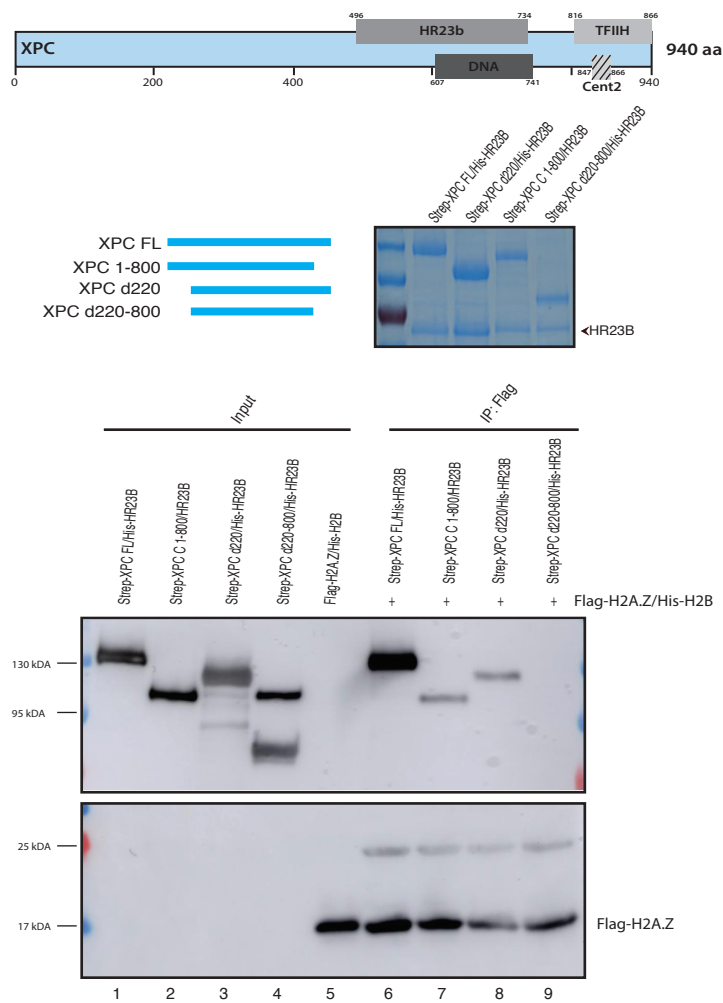


Figure 1: XPC interacts directly with histone variant H2A.Z

A-Mass spectrometry analysis of the different XPC subcomplexes.

B- Immunoprecipitation performed on nuclear extract of untreated XP-CWT fibroblasts with antibody against GFP, H2A.Z or IgG.

C- Blue staining of recombinant Flag-H2A.Z/His-H2B heterodimer and duplex strep-XPC/His-HR23B (left panel). In vitro co-immunoprecipitation assay performed by antibodies against Flag tag and IgG with the recombinant heterodimer Flag-H2A.Z/His-H2B and the duplex strep-XPC/His-HR23B.

D- Schematic representation of the XPC protein with the mutations and the interacting domains (upper panel). Blue staining of the different recombinant duplex truncated strep-XPC/His-HR23B (central panel). In vitro co-immunoprecipitation assay performed by antibodies against Flag tag with the recombinant heterodimer Flag-H2A.Z/His-H2B and the different duplex truncated strep-XPC/His-HR23B (lower panel).

RESULTS

XPC specifically interacts with histone variant H2A.Z

To comprehensively identify potential transcriptional partners of XPC, we performed an unbiased screen using GFP-trap with the aim to isolate XPC-containing complexes. For that purpose, we used a stable cell line from patients depleted of endogenous XPC (hereafter called XP-C^{DEL} ^{12,13}) and rescued with GFP-tagged human wild-type XPC to generate the so-called XP-C^{WT} cell line ¹⁴ (Figure S1). The hits that we detected solely in XP-C^{WT}, but not in the XP-C^{DEL}, were considered as *bona fide* XPC partners. Among them, Centrin 2 and HR23B were already found to functionally interact with XPC, validating our approach ^{9,15-18}. We also identified proteins related to gene expression pathway such as NSD3, TAF4, TAF15 and the Histone variant H2A.Z (Figure 1A and Table S1). Given that the proteomic analysis of H2A.Z containing complexes previously revealed the presence of XPC ¹⁹, we set out to investigate the biological relevance of this interaction.

In agreement with our mass spectrometry data, we found that XPC and H2A.Z reciprocally co-immunoprecipitated in nuclear extracts from undamaged XP-C^{WT} (Figure 1B). Furthermore, the immunoprecipitation of recombinant H2A.Z/H2B heterodimer pulled down the recombinant tagged heterodimer XPC/HR23B *in vitro* indicating a direct interaction between them (Figure 1C). Searching for domain(s) within XPC and H2A.Z that mediate their interaction, we performed co-IP using different recombinant truncated XPC and H2A.Z proteins (Figures 1D). The interaction between XPC and H2A.Z was lost following the co-deletion of both the N and C-terminal regions of XPC (Figure 1D).

Overall, these findings reveal the existence of an interaction between XPC and the

histone variant H2A.Z

Enrichment of XPC correlates with acetylation of H2A.Z

Next, we set out to investigate the functional relevance of XPC-H2A.Z interaction. We previously reported the genomic distribution of XPC in XP-C^{WT} cells treated 6 hours with all-trans Retinoic Acid (ATRA) and pointed out its localization with RNAPII on 1,797 binding events representing 1,529 genes ¹¹. Using ChIP-seq, we investigated the distribution of H2A.Z in both XP-C^{WT} and XPC^{DEL} cells treated 6 hours with ATRA. Of note, these cells showed equivalent steady-state level of H2A.Z (Figure S1A). Three independent series using XP-C^{WT} yielded 43,376 peaks for H2A.Z. Using HOMER annotation, we observed that around 30% of the H2A.Z binding events appeared at promoter regions in both XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells (Figure S1B). Among them, we identified 1,758 common H2A.Z and XPC/RNAPII binding events representing 98% of the previously identified XPC/RNAPII peaks (Figure 2A and Figure S1C).

We previously determined that the ATRA-dependent transactivation of 283 genes, over the 1,529 genes that were bound by XPC/RNAPII, was affected by the absence of XPC ¹¹. 100% of these genes showed H2A.Z enrichment at their promoter (Figure S1C). We then aimed at comparing the mean tag density of H2A.Z in XP-C^{WT} and XPC^{DEL} cells at two different classes of promoters; either the set of promoters from the 1,529 genes co-occupied by H2A.Z and XPC/RNAPII in XP-C^{WT} or the subset of 283 promoters co-occupied by H2A.Z and XPC/RNAPII and whose the related gene expression was affected by the absence of XPC. The absence of XPC did not affect either the density or the classical bimodal distribution of H2A.Z around the Transcription Starting Site (TSS) of these two classes of promoters (Figure 2B, upper

panels). These data indicate that the deposition of H2A.Z at XPC-dependent genes upon ATRA treatment does not depend on XPC.

H2A.Z is subject to PTM such as acetylation in its N-terminal region (H2A.Zac). We thus performed a comparative ChIP-seq analysis for H2A.Zac using both ATRA treated XP-C^{DEL} and XP-C^{WT} cells. We identified 1,695 common binding events representing 96% of the XPC/RNAPII peaks (Figure 2A). We did not detect differences in the mean tag density of H2A.Zac with or without XPC when we considered the 1,695 binding events co-occupied by XPC and RNAPII (Figure 2B, bottom left panel). However, ChIP-seq data comparison considering the previously identified 283 XPC-dependent genes suggest a decrease of H2A.Zac around these promoters in the absence of XPC (Figure 2B, bottom right panel). We then addressed the distribution of H2A.Z and H2A.Zac along *DAPK1*, a XPC-dependent gene¹¹. We observed higher binding events for H2A.Z and acH2A.Z around the TSS of the gene in XP-C^{WT} cells (Figure 2C). The absence of XPC did not impact H2A.Z distribution but fully depleted H2A.Zac (Figure 2C). ChIP confirmed the enrichment of H2A.Zac at the *DAPK1* promoter upon ATRA treatment in XP-C^{WT} cells and the deficient deposition of this mark in XP-C^{DEL} cells (Figure 2D, upper panel) that paralleled the deficient recruitment of XPC, RNAPII and the previously identified XPC-partner KAT2A (Figure S1C). We made identical observation when we considered *RAR α 2* (Figure S1C), another previously identified XPC-dependent gene¹¹. In marked contrast to acH2A.Z, the level of acetylation of the canonical H2A at the *DAPK1* promoter was not disturbed by the absence of XPC upon ATRA treatment, showing a specific effect of XPC on the acetylation of the H2A.Z variant (Figure 2D, lower panel). Note also that the deposition of H2A.Zac at the XPC-dependent *DAPK1*

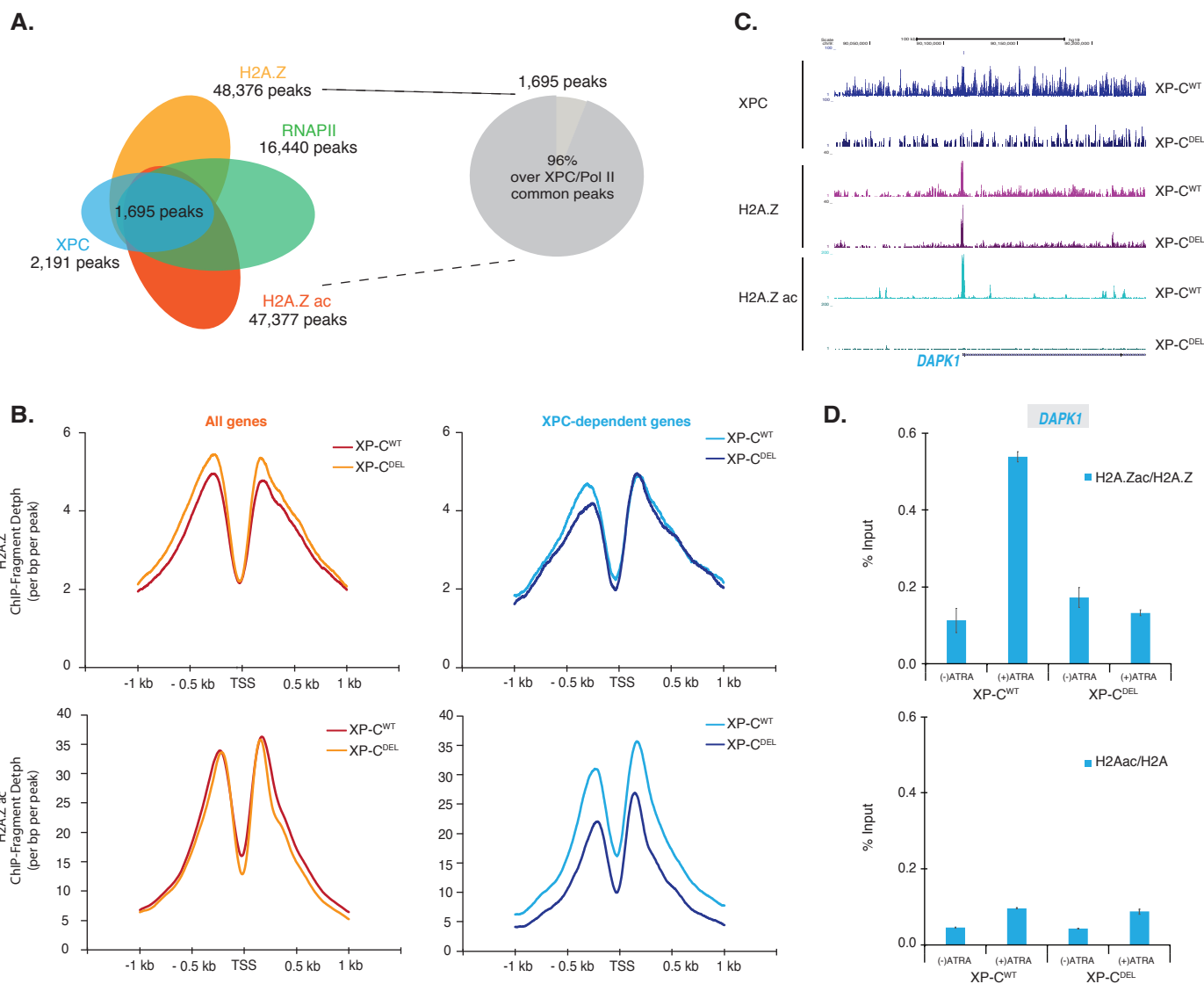


Figure 2: Association of XPC-bound promoters with H2A.Z and H2A.Zac

A- Overlapping of MACS14 determined peaks for RNAPII, XPC, H2A.Z and H2A.Zac in XP-CWT cells after ATRA induction. XPC, RNAPII, H2A.Z and H2A.Zac peaks correspond to recurrent peaks found in three independent ChIP-seq experiments (left diagram).

Proportion of promoter H2A.Z and H2A.Zac annotated peaks to overlap with RNAPII/XPC common peaks (right panel).

B- Diagrams representing the fragment depth of H2A.Z and H2A.Zac ChIP-seq experiments for all the XPC-targeted genes (left panels) and XPC-positively regulated (right panels) genes, as they were previously determined in XP-CWT and XP-CDEL cells.

C- UCSC genome browser for XPC, H2A.Z and H2A.Zac at *DAPK1* promoter as XPC-positively regulated genes.

D- Relative enrichment of H2A.Zac/H2A.Z (upper panel) and H2Aac/H2A (lower panel) monitored by ChIP at *DAPK1* promoter as XPC-positively regulated genes.

and *RARB2* promoters upon ATRA treatment was also observed in another wild-type cell line, the MRC5 fibroblasts (Figure S1D).

Our results together established that the recruitment of XPC at a subset of ATRA-dependent promoters strongly correlates with the deposition of H2A.Zac.

H2A.Z is part of the XPC/KAT2A/E2F1 complex

We previously demonstrated that XPC-positively regulated genes were characterized by the recruitment to their promoters of a complex containing XPC, KAT2A and the transcription factor E2F1 regulating the deposition of acetylated H3K9 (H3K9ac) ¹¹. To assess whether such complex was involved in the deposition of H2A.Zac on XPC-dependent gene promoters, we first performed co-immunoprecipitation against either KAT2A or E2F1 using nuclear extracts from untreated XP-C^{WT} cells and detected a complex containing H2A.Z in addition to XPC (Figure 3A). Furthermore, recombinant H2A.Z/H2B heterodimer was able to pull down either XPC, KAT2A, or E2F1 alone (Figure 3B, lanes 5-7) or XPC/KAT2A, XPC/E2F1, KAT2A/E2F1 complexes (Figure 3B, lanes 8-10). Finally, the recombinant XPC/KAT2A/E2F1 complex was immunoprecipitated with H2A.Z/H2B (Figure 3B, lane 11).

To determine the impact of the XPC/KAT2A/E2F1 complex on H2A.Zac deposition, we transiently transfected XP-C^{WT} cells with siRNA targeting KAT2A (Figure 3C). As previously shown ¹¹, the silencing of KAT2A specifically impaired *DAPK1* and *RARB2* transactivation, leaving intact that of genes such as *CCDN1* (Figure 3D). ChIP indicated that the silencing of KAT2A did not impact the recruitment of XPC but impaired the deposition of H2A.Zac at the *DAPK1* and *RARB2* promoters (Figure 3E). Similar results were obtained using siE2F1 (Figure S2A and S2B).

Together, these data suggest that the XPC/KAT2A/E2F1 complex is necessary for

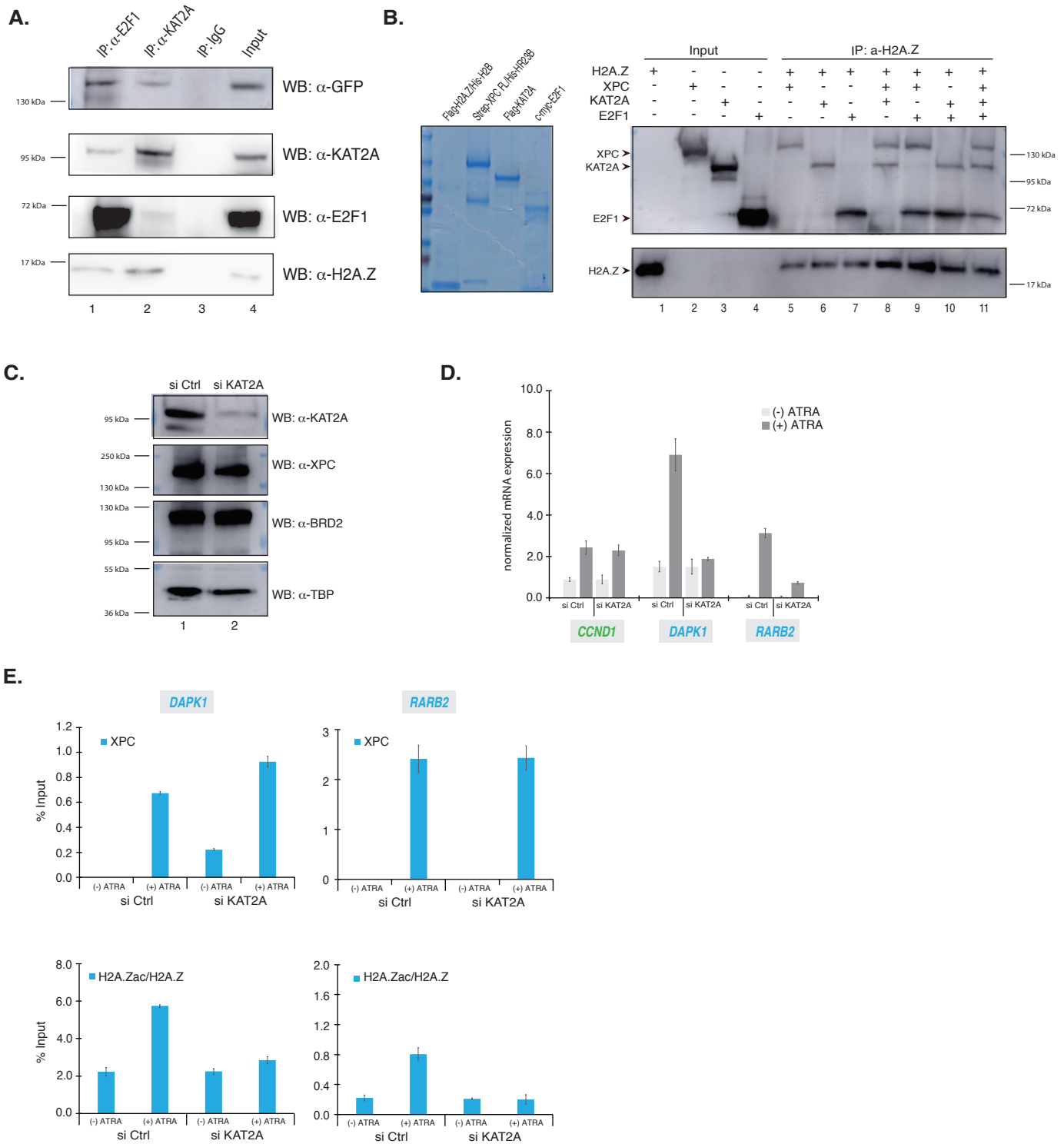


Figure 3: the complex XPC/KAT2A/E2F1 interacts with H2A.Z and regulates its acetylation

A- Immunoprecipitation performed on nuclear extract of untreated XP-CWT fibroblasts with antibody against KAT2A, E2F1 or IgG.

B- Blue staining of recombinant Flag-H2A.Z/His-H2B, duplex strep-XPC/His-HR23B, Flag-KAT2A and c-myc-E2F1 (left panel). In vitro co-immunoprecipitation assay performed by antibodies against H2A.Z with the different indicated combination of recombinant Flag-H2A.Z/His-H2B, duplex strep-XPC/His-HR23B, Flag-KAT2A and c-myc-E2F1 (right panel).

C- Relative protein expression of KAT2A, XPC, BRD2 and TBP in XP-CWT cells treated with siRNA targeting KAT2A (si KAT2A) or scrambled si RNA (si Ctrl) monitored by Western Blot.

D- Relative mRNA expression of CCND1, DAPK1 and RARB2, before and after ATRA treatment in si Ctrl and si KAT2A XP-CWT cells.

E- ChIP experiment monitoring the recruitment of XPC (upper panel) and the relative enrichment of H2A.Zac/H2A.Z (lower panel) at RARB2 and DAPK1 promoters, before and after ATRA treatment in si Ctrl and si KAT2A XP-CWT cells.

the deposition of H2A.Zac at the promoters of XPC-dependent genes.

The complex XPC/KAT2A/E2F1 acetylates H2A.Z through KAT2A HAT activity

We then sought to test whether the HAT activity of KAT2A could be involved in the acetylation of H2A.Z. We first treated XP-C^{WT} cells with the KAT2A inhibitor α -methylene- γ -butyrolactone 3 (MB-3) and observed that MB-3 treatment decreased the global level of H3K9ac, but left intact the global level of H2A.Zac (Figure 4A). In agreement with the involvement of KAT2A in XPC-dependent gene expression, MB-3 treatment impaired the transactivation of *DAPK1* and *RARB2* while expression of *CCND1* remained unchanged (Figure 4B). Inhibition of *DAPK1* and *RARB2* expression by MB-3 was accompanied by a decreased recruitment of RNAPII, XPC, KAT2A and E2F1 at the corresponding promoters that correlated with a lower enrichment of H3K9ac and H2A.Zac (Figure 4C).

To test whether H2A.Z can be acetylated by KAT2A *in vitro*, we performed HAT assays on recombinantly expressed H2A.Z/H2B heterodimer in the presence of acetyl-CoA and purified recombinant human KAT2A (Figure 4D). Interestingly, addition of KAT2A led to acetylation of H2A.Z (Figure 4D, lanes 2-4). Such enzymatic reaction was inhibited in presence of MB-3 (Figure 4D, compared lanes 2-4 with lanes 5-7). We next evaluated the impact of XPC and E2F1 on the HAT activity of KAT2A on H2A.Z. Either XPC, E2F1 alone or together in complex with KAT2A did not increase the acetylation of H2A.Z *in vitro* (Figure 4E).

These results together suggest that the XPC/KAT2A/E2F1 complex regulates the deposition of H2A.Zac at the promoters of XPC-dependent genes through the HAT activity of KAT2A.

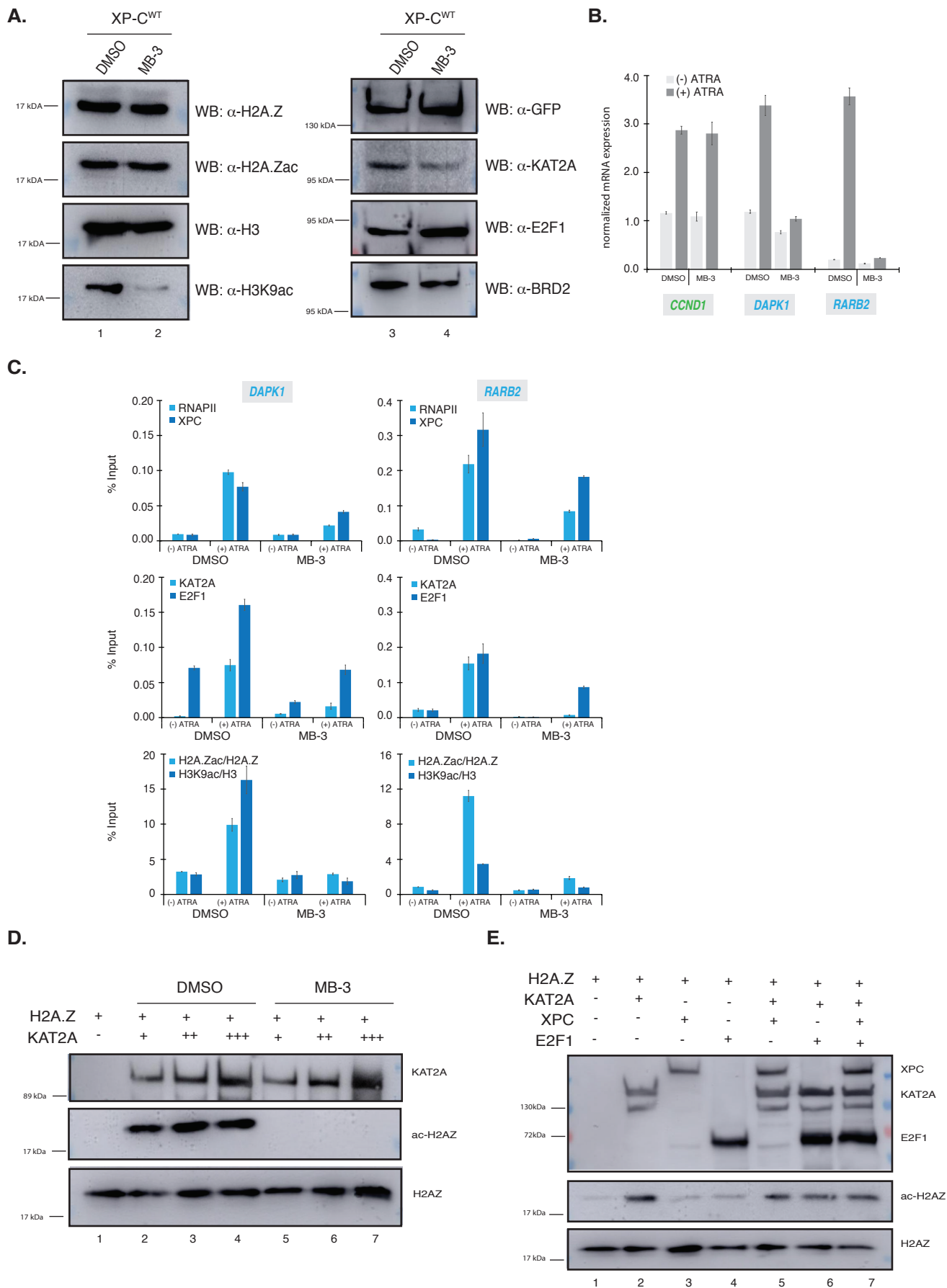


Figure 4: KAT2A acetylates Histone variant H2A.Z

A- Relative protein expression, monitored by Western Blot, of Histones H2A.Z, H3, XPC, KAT2A, E2F1 and BRD2 as well as levels of H2A.Zac and H3K9ac from whole cell and nuclear extracts from XP-CWT cells treated with KAT2A-inhibitor MB-3 or DMSO.

B- Relative mRNA expression of CCND1, DAPK1 and RARB2, before and after ATRA treatment in XP-CWT cells previously treated with either MB-3 or DMSO.

C- ChIP experiment monitoring the recruitment of RNAPII, XPC (upper panel), KAT2A, E2F1 (middle panel) and the relative enrichment of H2A.Zac/H2A.Z and H3K9ac/H3 (lower panel) at RARB2 and DAPK1 promoters, before and after ATRA treatment in XP-CWT cells previously treated with either MB-3 or DMSO.

D- In vitro Histone Acetyl-Transferase (HAT) Assay, detected by Western Blot with specific antibodies, monitoring the KAT2A acetylation activity on H2A.Z by mixing increasing amounts of recombinant Flag-KAT2A with recombinant Flag-H2A.Z/His-H2B in presence of either DMSO or KAT2A inhibitor MB-3.

E- In vitro Histone Acetyl-Transferase (HAT) Assay, detected by Western Blot, monitoring the KAT2A acetylation activity on recombinant Histone H2A.Z in presence of the duplex strep-XPC/His HR23B and myc-E2F1 alone or in combination together.

XPC/KAT2A/E2F1 complex recruits BRD2 to XPC-dependent transactivated genes

Next, we set out to investigate the role of the XPC-dependent deposition of H2A.Zac during gene transactivation. It was previously reported that the chromatin remodeler protein BRD2 (Bromodomain Containing 2) interacts with E2F1 and regulates E2F1-targeted genes through an interaction with H2A.Zac ²⁰. We thus first assessed whether BRD2 could be part of the XPC/KAT2A/E2F1/H2A.Z complex identified above. We performed co-immunoprecipitation against either BRD2, H2A.Z or XPC using nuclear extracts from untreated XP-C^{WT} cells and detected a complex containing BRD2, H2A.Z, KAT2A, E2F1 and XPC (Figure 5A, lanes 1-3).

To test whether BRD2 was involved in XPC-dependent gene expression we treated XP-C^{WT} cells during 24 hours with two different inhibitors: the BRD2/BRD4 inhibitor JQ1 and the specific BRD2 inhibitor BIC-1 ²¹. Both JQ1 and BIC-1 treatments did not modify the steady levels of BRD2, XPC, KAT2A and E2F1 and did not impact global histones PTMs including H3K9ac and H2A.Zac (Figure S3A). Treatment with JQ1 or BIC-1 impaired the ATRA-dependent transactivation of the XPC-dependent genes *DAPK1* and *RARB2* (Figure 5B), but left intact that of the control *CCND1* (Figure S3B).

Using ChIP, we detected enrichment of BRD2 at the XPC-dependent *DAPK1* and *RARB2* promoters in XP-C^{WT} cells treated with ATRA (Figure 5C, upper panel). Interestingly, BRD2 was not detected at these promoters in the absence of XPC (Figure 5C, upper panel), in the absence of KAT2A or E2F1 (Figure 5C, middle panel) or after treatment with MB-3 (Figure 5C, lower panel). Together, these results

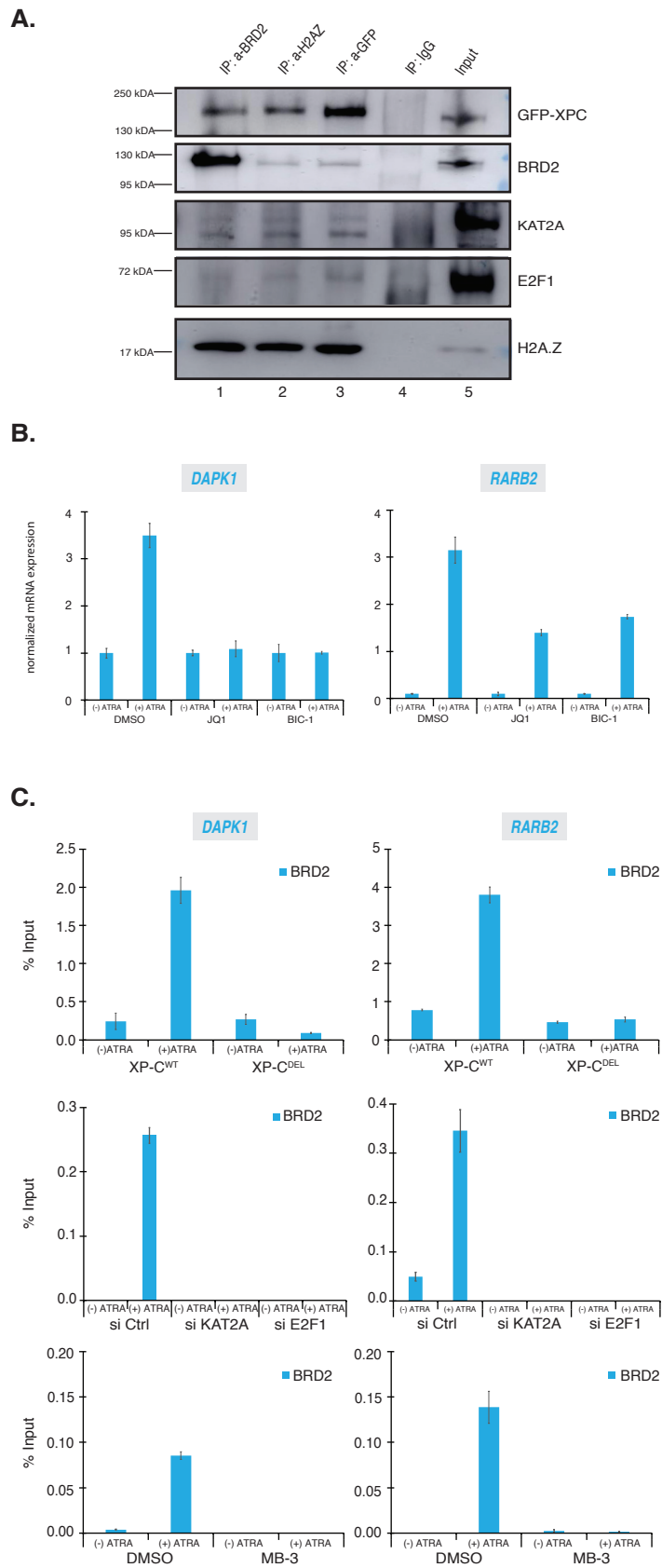


Figure 5: The complex XPC/KAT2A/E2F1 by acetylating H2A.Z drives the recruitment of BRD2 at activated XPC-targeted promoters

A- Immunoprecipitation performed on nuclear extract of untreated XP-CWT fibroblasts with antibody against BRD2, H2A.Z, GFP or IgG. Detection by Western Blot of XPC, BRD2, KAT2A, E2F1 and H2A.Z in the different immunocomplexes.

B- ChIP experiment investigating the occupancy of BRD2 at RARB2 and DAPK1 promoters, before and after ATRA treatment, in XP-CWT cells previously treated with either DMSO or BRD inhibitors JQ1 and BIC-1.

C- ChIP experiment investigating the occupancy of BRD2 at RARB2 and DAPK1 promoters, before and after ATRA treatment, in XP-CWT and XP-CDEL cells.

D- ChIP experiment monitoring the recruitment of BRD2 at RARB2 and DAPK1 promoters, before and after ATRA treatment in si Ctrl, si KAT2A, si E2F1 XP-CWT cells.

E- ChIP experiment monitoring the recruitment of BRD2 at RARB2 and DAPK1 promoters, before and after ATRA treatment in XP-CWT cells previously treated with either MB-3 or DMSO.

showed that XPC/KAT2A/E2F1 complex allow the recruitment of the chromatin remodeler BRD2 to XPC-dependent genes after ATRA treatment.

DISCUSSION

We show in this study that XPC regulates transactivation of a subset of RAR-dependent genes by interacting with histone variant H2A.Z on one side and KAT2A on the other side. This molecular bridge triggers acetylation of H2A.Z by KAT2A required for the subsequent recruitment of the chromatin remodeler BRD2 and the initiation of gene expression. Our work then describes early events implicated in RAR-dependent gene activation.

XPC is an epigenetic regulator of RAR-target genes

The pleiotropic effects of retinoids are mediated by the ligand-activated transcription factors RARs (forming heterodimers with RXRs) that orchestrate the transcription of specific genes through binding to specific DNA response element (RARE). The main role of RARs is the recruitment of cofactors that shape the local chromatin environment and ensure the loading of the basal transcriptional machinery to promoters. Earlier studies established several orderly temporal steps to explain the dynamics of NR-target gene regulation and chromatin remodelling. Upon ligand binding and conformational changes of RARs/RXRs, corepressors are dissociated from the nuclear receptors and replaced by HATs (CBP/p300, SRC-3), HMTs (CARM-1), kinases (CDK7), Ubiquitin E3-ligases (Cullin 3/RBX1), ATP-dependent remodelling complexes (SWI/SNF) that decompact repressive chromatin. Then the coactivators dissociate from RARs/RXRs and are replaced by the Mediator complex ensuring chromatin rearrangements as well as the formation and the functions of the basal transcriptional machinery at promoters^{22,23}. The involvement of DNA repair factors in the regulation of RAR-target genes has been recently discovered and

refreshed this model by introducing the importance of DNA breaks, active DNA demethylation and DNA conformation in the RAR-dependent transactivation ². Among NER factors, we have recently identified a complex including XPC, transcription factor E2F1 and KAT2A that was specifically recruited to a subset of RAR/E2F1-dependent promoters, conditioning the presence of the ATAC complex and the deposition of the H3K9ac mark ¹¹. Surprisingly, we provide evidence in the present study that XPC also conditioned the deposition of acH2A.Z at the same set of promoters (Figures 2 and 3). In the absence of XPC, the acetylation of H3 and H2A.Z was totally lost upon ATRA treatment, which subsequently impaired gene expression. If the PTMs of histones was affected in the absence of XPC, we didn't notice changes in the deposition of H2A.Z (Figure 2), suggesting that XPC probably not participated in the incorporation or the eviction of the histone variant. Moreover, we observed that the acetylation of the canonical H2A was not influenced by XPC, establishing that the DNA damage sensor XPC can be consider as a master epigenetic regulator of RAR-mediated transcription regulating specific histone PTMs.

KAT2A acetylates H2A.Z to initiate XPC-dependent gene expression

The amino-terminal tail of H2A.Z is extensively modified by lysine acetylation that is a crucial H2A.Z PTM. Indeed, acH2A.Z only localizes at the TSSs of active genes and is intimately linked to active transcription ²⁴. In line with these observation, our data also indicated that acH2A.Z was enriched at the TSS of XPC-targeted genes upon ATRA treatment. In *Saccharomyces cerevisiae*, HAT ESA1 and gcn5 (yeast orthologs of TIP60 and KAT2A) mediate the acetylation of Htz1 (yeast ortholog of H2A.Z). In mammals, it has been demonstrated that TIP60 associates with H2A.Z

²⁵ and that its silencing induces a reduction of acH2A.Z at the TSS of estrogen receptor-dependent genes ²⁶ suggesting that this HAT triggers acetylation of H2A.Z. However, acetylation of H2A.Z by TIP60 *in vitro* was never reported. Our data suggest that KAT2A is a *bona fide* H2A.Z HAT, at least for XPC-dependent gene expression. This is supported by the fact that the silencing of KAT2A and its enzymatic inhibition induces a lower deposition of acH2A.Z at XPC-bound promoters (Figures 3 and 4) and also by our finding that KAT2A specifically acetylated H2A.Z *in vitro* (Figure 4). It remains to be determined if both KAT2A and TIP60 acetylate H2A.Z in different cellular situations. Nevertheless, our data provide strong evidences that KAT2A is the HAT that acetylates H2A.Z at the TSS of XPC-regulated genes upon ATRA stimulation.

The recruitment of the chromatin remodeler BRD2 dependent on XPC-dependent acetylation of H2AZ

Having demonstrating that XPC mediated the acetylation of H2A.Z by KAT2A we next wondered what was the role of acH2A.Z in XPC-dependent gene transactivation. Earlier studies reported that the chromatin remodeler BRD2 bound to aminoacetyl groups of nucleosomal histone lysines and particularly associated with acH2A.Z-containing nucleosomes ^{20,27}. Here our study demonstrated that BRD2 accumulated at the promoter of XPC-dependent genes upon ATRA treatment and that a specific BRD2 inhibitor affected the expression of XPC-dependent genes. In agreement with a role of acH2A.Z in the recruitment of BRD2 to XPC-dependent genes, the chromatin remodeler was removed from these promoters in the absence of XPC or following the inhibition of KAT2A activity. These results are therefore

consistent with a model in which chromatin remodelling and pre-initiation complex formation at XPC-dependent genes is ensured by the recruitment of BRD2 to the TSS of these genes after the acetylation of H2A.Z by KAT2A.

XPC-acH2A.Z-BRD2-E2F1 axis and XP-C phenotypes

Understanding the roles played by NER factors is of prime importance not only to unveil the molecular details of gene expression but also to understand how mutations in their corresponding genes give rise to several human autosomal recessive disorders like *Xeroderma pigmentosum* (XP), Cockayne syndrome (CS) and Trichothiodystrophy (TTD). Patients bearing mutations in *XPC* only develop XP (XP-C) and represent the most frequent NER defective group. XP is clinically characterized by an extreme sensitivity to UV rays from sunlight. XP patients develop severe sunburns and are highly susceptible to develop tumours on sunlight-exposed areas of the skin, including melanoma and squamous cell carcinoma ²⁸. XP individuals also present increased susceptibility for lung, breast and colorectal cancers with possible neurological issues ²⁹. The XP pathology has been primarily defined as a DNA repair syndrome due to the inability of patients' cells to eliminate DNA lesions. However, the description of different mechanisms involving XPC in transcription suggest that some of their phenotypes may also stem from transcriptional deregulations. Although the dissection of the molecular mechanisms involving NER factors in RAR-dependent expression cannot explain XP phenotypes on their own, they bring some new leads to see XP-C phenotypes in a new light. Indeed, inappropriate acetylation levels have been associated with an aberrant transcription of disease-promoting genes including cancer-related ones. In addition,

BET family proteins have been reported to be involved in a variety of tumours. Work by Denis and colleagues initially demonstrated that BRD2 has oncogenic potential (Denis et al., 2000). More interestingly, recent findings evidenced an H2A.Z-BRD2-E2F1 axis promoting proliferation in melanoma tissues ²⁰. In accordance with clinical features developed by XP-C patients, our data linking XPC with such H2A.Z-BRD2-E2F1 axis could be important for the understanding of skin cancers characterizing such pathology.

Acknowledgments

We are grateful to A. Hamiche, A. Poterszman and L. Tora (IGBMC) for their respective constructs, to members of our team. We thank IGBMC antibodies and cell culture facilities. Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the “France Génomique” consortium (ANR-10-INBS-0009). This study was supported by l’Association de la Recherche contre le Cancer (ARC n°SL220130607082) and the National Research Foundation of Korea for International Collaboration. This study was supported by the Ligue contre Le cancer (CCIR-GE 2015). This study was supported by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d’Avenir ANR-10-IDEX-0002-02. B.B was supported by the *fondation pour la recherche médicale (FDT20160736467)*. M.S was supported by le prix d'encouragement à la recherche de la province Sud (Nouvelle Calédonie).

Author Contributions

LM.N and F.C designed the study. S.M., B.B., L.A., LM.N. performed experiments. LM.N. and F.C supervised the research and wrote the manuscript with input from all the authors.

Authors declare no conflict of interest and no competing interests

METHODS

Cell Culture

XP-C patients derived fibroblasts GM14867 (XP-C^{DEL}) and GM02096 (XP-C^{MUT}) and rescued XP-C (XP-C^{WT})^{12,14} (Coriell Institute) and MRC5 fibroblasts (ATCC # CCL-171) were used and cultured in appropriate medium. Twelve hours before ligand treatment, cells were incubated with phenol red-free medium containing charcoal treated FCS and 40mg/ml gentamycin.

Cells were treated for 6 hours with 10 μ M all-trans retinoic acid (ATRA) (MP). To inhibit KAT2A HAT activity, cells were treated 15 hours with 400 μ M MB-3 (Sigma) including or not ATRA treatment. Similarly, cells were treated with BET inhibitor JQ1 (Sigma) at 1 μ M or BRD2 inhibitor II BIC-1 (Millipore) at 4 μ M for 24 hours including or not ATRA treatment.

Mass spectrometry

Nuclear extract was prepared from untreated XP-C^{WT} cells as previously described¹⁹. A total of 500 μ g of nuclear extract was incubated with GFP-Trap beads as indicated by the manufacturer (Chromotek). Immunoprecipitated GFP-XPC containing complexes were washed and eluted as indicated (Chromotek). Identification of proteins was performed using Orbitrap Elite coupled to Nano-LC RSLC analysis (Thermo scientific).

Reverse Transcription and Quantitative PCR

Total RNA was isolated from several cell lines using a GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma) and reverse transcribed with SuperScript IV reverse transcriptase (Invitrogen). The quantitative PCR was done using the Lightcycler 480 (Roche). The primer sequences for the different genes used in qPCR are indicated in

supplementary table 2. The mRNA expression of the different analysed genes represents the ratio between values obtained from treated and untreated cells normalized with the housekeeping *GAPDH* mRNA.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Cells were cross-linked at room temperature (RT) for 10 min with 1% formaldehyde. Chromatin was prepared and sonicated on ice for 30 minutes using sonicator Q800R (Qsonica) as previously described ³⁰. Samples were immunoprecipitated with antibodies at 4°C overnight, and protein G coated Dynabeads (Invitrogen) were added, incubated for 4 hours at 4°C, and sequentially washed. Protein-DNA complexes were eluted and decrosslinked. DNA fragments were purified using QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) and analyzed by qPCR using a set of primers indicated in supplementary table 2.

ChIP-seq analysis

Purified DNA fragments analyzed by ChIP-seq were prepared by using the ChIP-IT High Sensitivity Kit (Active Motif) and the related antibodies. ChIP-seq was performed on an Illumina HiSeq 2500 as single-end 50 base reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 1.17.20 and CASAVA 1.8.2. Reads were mapped onto the hg19 assembly of the human genome. Peak detection was performed using MACS (<http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/>) under settings where the input fraction was used as negative control. Peaks detected were annotated using HOMER (<http://biowhat.ucsd.edu/homer/ngs/annotation.html>) as well as TSS protein enrichment comparison. As reference coordinates, we used the MACS-determined peaks or the annotated TSS/TTS of human genes as defined by RefSeq database.

Sequence enrichment was performed using RSAT (<http://rsat.sb-roscoff.fr>) with MACS-determined peaks as reference.

Plasmids and purification of recombinant proteins

PCR products for the entire coding sequence XPC and the truncated mutants XPC¹⁻⁸⁰⁰, XPC^{delta 200}, XPC^{delta 200-800} were cloned into pDONOR-207 vector using the Gateway system (Invitrogen) and later cloned in bicistronic plasmid VEAP5317 with hHR23B kindly obtained from A. Poterszman. For recombinant Flag-GCN5 expression in Sf9 cells, the corresponding vector pSK227-GCN5 was kindly provided by L. Tora³¹. PCR product for the entire coding sequence E2F1 was also cloned into pDONOR-207 vector and later sub-cloned in pAC8 vector. Sf9 cells were infected with baculoviruses expressing a FLAG-tagged GCN5, Strep tactin-tagged XPC/ His-tagged hHR23B or c myc-tagged E2F1, and the harvested recombinant proteins were purified as previously described³².

The bicistronic pET28b vector expressing N-terminal His tag H2B and Flag-tagged H2A.Z was kindly provided by A. Hamiche. Histones were expressed in BL21-CodonPlus- RIL (Stratagene) and purified as previously described³³.

siRNA transfection

ON-TARGET plus smart pool siRNA control or targeting human KAT2A were purchased from Thermo scientific and transfected in XP-C^{WT} cells at a final concentration of 100nM using X-tremeGENE siRNA transfection reagent (Sigma-Aldrich) following manufacturer protocol.

Co-immunoprecipitation

For *in vivo* co-IPs, nuclear extracts from untreated XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells were

prepared as previously described ³⁴. After GFP-trap or H2A.Z, KAT2A, E2F1 or BRD2 Immunoprecipitation using the appropriate antibodies conjugated to protein G coated Dynabeads (Invitrogen), followed by extensive washes, was carried out and the different co-precipitated proteins were detected using an specific antibodies after immunoblotting.

For *in vitro* co-IPs, the recombinant purified Flag-H2A.Z/His-H2B heterodimer was then incubated with the different combination of recombinant purified proteins including Strep-XPC/His-hHR23B, KAT2A, E2F1 and BRD2 before Flag immunoprecipitation was carried out. After washes, bound proteins were resolved by SDS-PAGE and detected by western blot.

Histone acetyltransferase assay

The HAT of KAT2A was then measured using histone acetyltransferase assay as previously described ³⁵. For the HAT assay, recombinant H2A.Z/H2B heterodimers were incubated with KAT2A HAT and the other putative partners (XPC/HR32B, E2F1) in the presence of acetyl-CoA (without in case of mock reaction) in HAT buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 7% glycerol, 25 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT) for 1 hr at 30°C. The reaction was then analysed by western blotting with specific antibodies (H2A.Z and H2A.Z ac) and the activity of the enzyme was checked using antibodies against known specific targets.

Antibodies

Antibodies towards RNA Pol II, TBP and KAT2A antibodies were produced at the IGBMC. XPC (D-18), E2F1 (C-20) antibodies were purchased by Santa-Cruz Biotechnology and BETHYL respectively. H2A.Z ac (18262) and BRD2 (CI1907) antibodies was purchased by Abcam and BOSTER respectively. Antibodies against

H3 (#4620), XPC (A301-122A) and KAT2A (2676) were obtained from Cell signalling, Bethyl and Epigentek respectively. Antibodies against H3K9ac (61251) and H2A.Z (39113) were from Active Motif. Flag M2 (F1804) and GFP (TP401) Antibodies were purchased by Sigma and Torrey Pines Biolabs respectively. For immunoblot, the concerned antibodies were diluted at 1 to 1000 while 5-10 ug of antibodies were used for ChIP experiments.

Data availability

All relevant data are available from the authors

REFERENCES

- 1 Brivanlou, A. H. & Darnell, J. E., Jr. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* **295**, 813-818. (2002).
- 2 Fong, Y. W., Cattoglio, C. & Tjian, R. The intertwined roles of transcription and repair proteins. *Mol Cell* **52**, 291-302, doi:S1097-2765(13)00784-3 [pii] 10.1016/j.molcel.2013.10.018 (2013).
- 3 Pavri, R. *et al.* PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Molecular Cell* **18**, 83-96, doi:10.1016/j.molcel.2005.02.034 (2005).
- 4 Ju, B. G. *et al.* A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* **312**, 1798-1802, doi:312/5781/1798 [pii] 10.1126/science.1127196 (2006).
- 5 Cortellino, S. *et al.* Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* **146**, 67-79, doi:10.1016/j.cell.2011.06.020 (2011).
- 6 Um, S. *et al.* Retinoic acid receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* **273**, 20728-20736 (1998).
- 7 Le May, N., Egly, J. M. & Coin, F. True lies: the double life of the nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair. *J Nucleic Acids* **2010**, doi:10.4061/2010/616342 (2010).
- 8 Le May, N., Fradin, D., Iltis, I., Bougneres, P. & Egly, J. M. XPG and XPF endonucleases trigger chromatin looping and DNA demethylation for accurate expression of activated genes. *Mol Cell* **47**, 622-632, doi:S1097-2765(12)00500-X [pii] 10.1016/j.molcel.2012.05.050 (2012).
- 9 Fong, Y. W. *et al.* A DNA repair complex functions as an Oct4/Sox2 coactivator in embryonic stem cells. *Cell* **147**, 120-131, doi:S0092-8674(11)01008-7 [pii] 10.1016/j.cell.2011.08.038 (2011).
- 10 Cattoglio, C. *et al.* Functional and mechanistic studies of XPC DNA-repair complex as transcriptional coactivator in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E2317-2326, doi:10.1073/pnas.1505569112 (2015).
- 11 Bidon B., I. I., Semer M., Nagy Z., Larnicol A., Cribier A., Benkirane M., Coin F., Egly J-M. & Le May N. XPC is an RNA Polymerase II cofactor recruiting ATAC to promoters by interacting with E2F1 *Nature Communications* (2018).
- 12 Bernardes de Jesus, B. M., Bjoras, M., Coin, F. & Egly, J. M. Dissection of the Molecular Defects Caused by Pathogenic Mutations in the DNA Repair Factor XPC. *Mol Cell Biol* **28**, 7225-7235 (2008).
- 13 Gozukara, E. M. *et al.* A stop codon in xeroderma pigmentosum group C families in Turkey and Italy: molecular genetic evidence for a common ancestor. *J Invest Dermatol* **117**, 197-204 (2001).
- 14 Nishi, R. *et al.* UV-DDB-dependent regulation of nucleotide excision repair kinetics in living cells. *DNA Repair (Amst)* **8**, 767-776, doi:S1568-7864(09)00049-4 [pii] 10.1016/j.dnarep.2009.02.004 (2009).

- 15 Araki, M. *et al.* Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 18665-18672, doi:Doi 10.1074/Jbc.M100855200 (2001).
- 16 Masutani, C. *et al.* Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *Embo J* **13**, 1831-1843 (1994).
- 17 Shivji, M. K. K., Podust, V. N., Hubsher, U. & Wood, R. D. Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* **34**, 5011-5017 (1995).
- 18 Scharer, O. D. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012609, doi:5/10/a012609 [pii] 10.1101/cshperspect.a012609 (2013).
- 19 Obri, A. *et al.* ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature* **505**, 648-653, doi:10.1038/nature12922 (2014).
- 20 Vardabasso, C. *et al.* The Histone Variant H2az2 Regulates Proliferation in Melanoma. *Cancer Discov* **5**, 795-795, doi:10.1158/2159-8290.CD-RW2015-112 (2015).
- 21 Fu, L. L. *et al.* Inhibition of BET bromodomains as a therapeutic strategy for cancer drug discovery. *Oncotarget* **6**, 5501-5516, doi:10.18632/oncotarget.3551 (2015).
- 22 Bastien, J. & Rochette-Egly, C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328**, 1-16 (2004).
- 23 Chen, W. & Roeder, R. G. Mediator-dependent nuclear receptor function. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 749-758, doi:10.1016/j.semcdb.2011.07.026 (2011).
- 24 Valdes-Mora, F. *et al.* Acetylation of H2A.Z is a key epigenetic modification associated with gene deregulation and epigenetic remodeling in cancer. *Genome Research* **22**, 307-321, doi:10.1101/gr.118919.110 (2012).
- 25 Li, Z. *et al.* Foxa2 and H2A.Z mediate nucleosome depletion during embryonic stem cell differentiation. *Cell* **151**, 1608-1616, doi:10.1016/j.cell.2012.11.018 (2012).
- 26 Dalvai, M., Fleury, L., Bellucci, L., Kocanova, S. & Bystricky, K. TIP48/Reptin and H2A.Z requirement for initiating chromatin remodeling in estrogen-activated transcription. *PLoS Genet* **9**, e1003387, doi:10.1371/journal.pgen.1003387 (2013).
- 27 Draker, R. *et al.* A combination of H2A.Z and H4 acetylation recruits Brd2 to chromatin during transcriptional activation. *PLoS Genet* **8**, e1003047, doi:10.1371/journal.pgen.1003047 (2012).
- 28 Cleaver, J. E. Splitting hairs--discovery of a new DNA repair and transcription factor for the human disease trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst)* **4**, 285-287 (2005).
- 29 Bootsma, D., Kraemer, K. H., Cleaver, J. E. & Hoeijmakers, J. H. J. Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy. *The Genetic Basis of Human Cancer* **The Genetic Basis of Human Cancer In: (second ed.)**, B. Vogelstein and K.W. Kinzler, Editors,, 211-237 (2002).

- 30 Le May, N. *et al.* NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol Cell* **38**, 54-66, doi:S1097-2765(10)00211-X [pii] 10.1016/j.molcel.2010.03.004 (2010).
- 31 Demeny, M. A. *et al.* Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes. *PLoS One* **2**, e316, doi:10.1371/journal.pone.0000316 (2007).
- 32 Singh, A., Compe, E., Le May, N. & Egly, J. M. TFIIF Subunit Alterations Causing Xeroderma Pigmentosum and Trichothiodystrophy Specifically Disturb Several Steps during Transcription. *Am J Hum Genet* **96**, 194-207, doi:S0002-9297(14)00518-7 [pii] 10.1016/j.ajhg.2014.12.012 (2015).
- 33 Shuaib, M., Ouararhni, K., Dimitrov, S. & Hamiche, A. HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1349-1354, doi:10.1073/pnas.0913709107 (2010).
- 34 Nagy, Z. *et al.* The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 611-628, doi:10.1007/s00018-009-0199-8 (2010).
- 35 Di Cerbo, V. *et al.* Acetylation of histone H3 at lysine 64 regulates nucleosome dynamics and facilitates transcription. *Elife* **3**, e01632, doi:10.7554/eLife.01632 (2014).

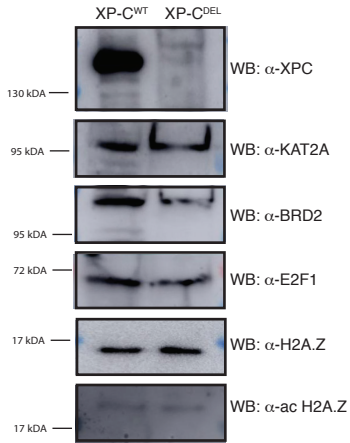
Supplemental Table legends

Table S1: List of proteins found in the mass spectrometry analysis of XPC-subcomplexes.

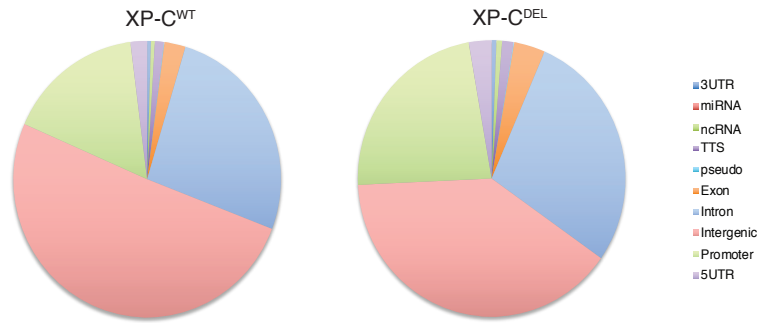
Table S2: List of primers and their sequences

Supplementary Figure 1

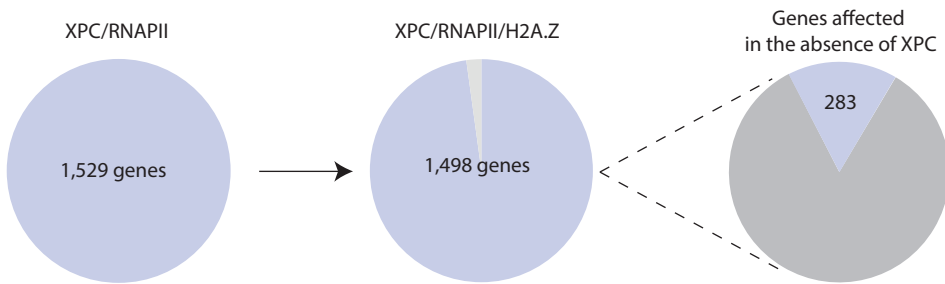
A.



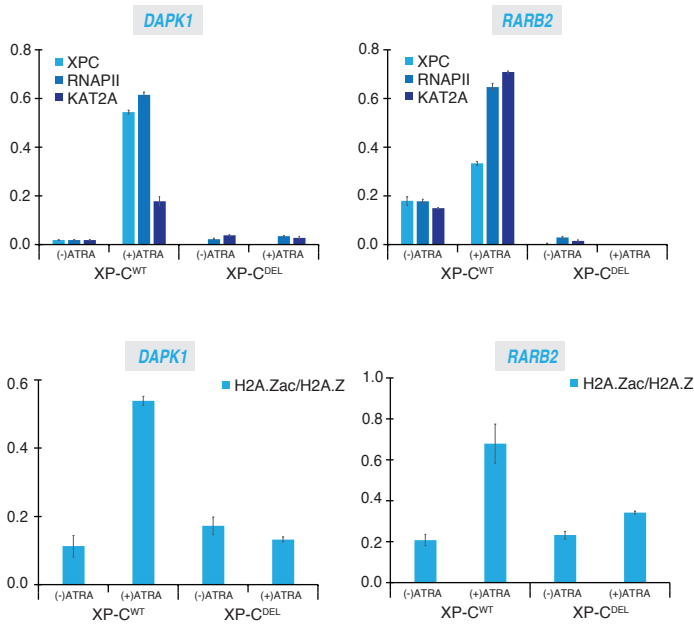
B.



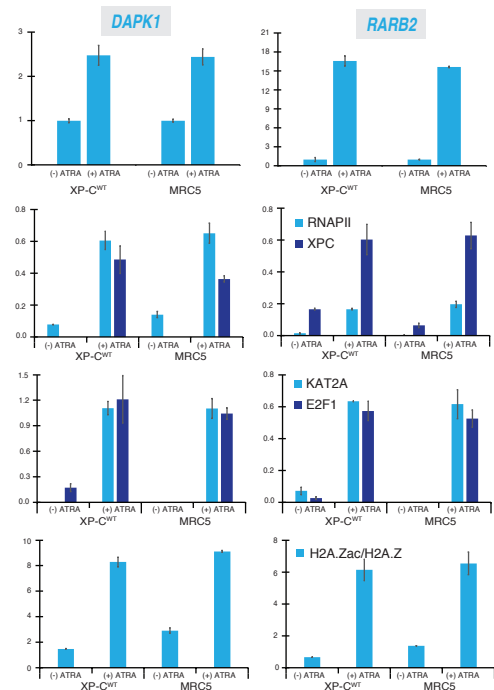
C.



D.



E.



Supplementary Figure 1: H2A.Z and H2A.Zac genome wide distribution and overlapping at RNAPII/XPC-targeted promoters

A- Relative protein expression of XPC, KAT2A, BRD2, E2F1, H2A.Z and H2A.Zac analysed by Western Blot from whole cell and nuclear extracts from XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells.

B- HOMER annotation of H2A.Z in XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells.

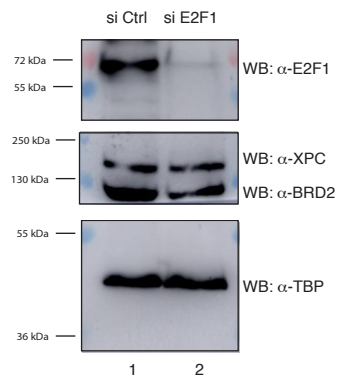
C- Proportion of genes annotated by H2A.Z at promoters to overlap with RNAPII/XPC co-targeted promoters related genes among the 283 XPC-positively regulated genes.

D- ChIP experiment monitoring the recruitment of XPC, RNAPII and KAT2A (upper panels) and the relative enrichment of H2A.Zac/H2A.Z (lower panels) at *RARβ2* and *DAPK1* promoters, before and after ATRA treatment in XP-C^{WT} and XP-C^{DEL} cells.

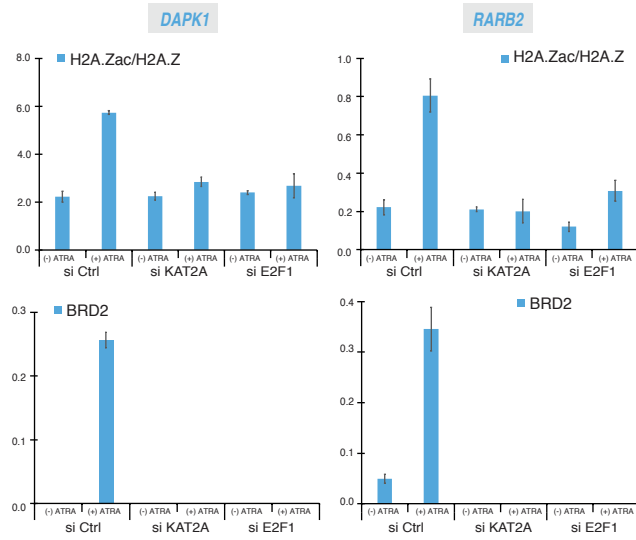
E- Fold induction of *RARβ2* and *DAPK1* in XP-C^{WT} and MRC5 fibroblasts, after ATRA treatment during 6 hours (upper panels). Occupancy of XPC, RNAPII, KAT2A, E2F1 (central panels) and enrichment of H2A.Zac/H2A.Z (lower panels) at promoters of *DAPK1* and *RARβ2*, monitored by ChIP from chromatin extracts of XP-C^{WT} and MRC5 cells in presence or absence of ATRA.

Supplementary Figure 2

A.



B.



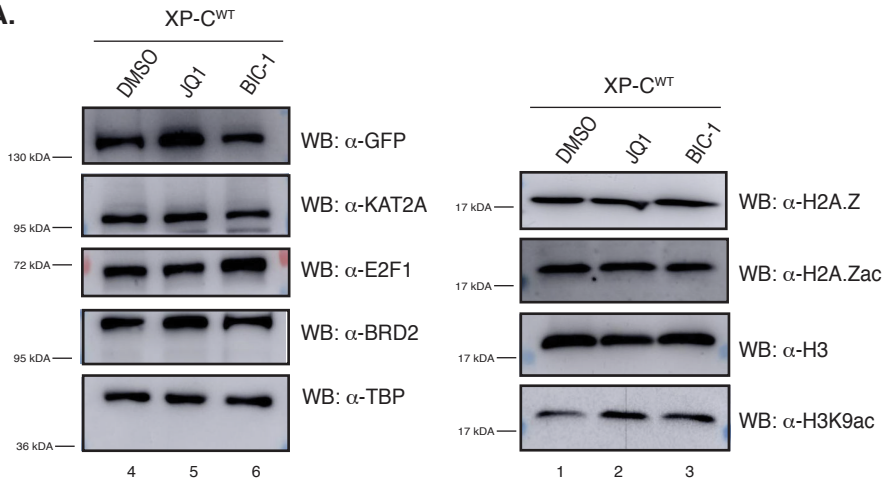
Supplementary Figure 2: Silencing of E2F1 impairs the deposition of H2A.Zac at promoters targeted by XPC/KAT2A/E2F1 complex

A- Relative protein expression of XPC, BRD2, E2F1 and TBP analysed by Western Blot from whole cell extracts from si Ctrl and siE2F1 XP-C^{WT} cells.

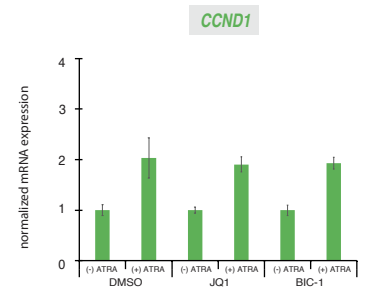
B- ChIP experiment monitoring the relative enrichment of H2A.Zac/H2A.Z (upper panel) and the occupancy of BRD2 (lower panel) at *RARβ2* and *DAPK1* promoters, before and after ATRA treatment in si Ctrl, si KAT2A and si E2F1 XP-C^{WT} cells.

Supplemental Figure 3

A.



B.



Supplementary Figure 3: Effects of BRD2 inhibitors JQ1 and BIC-1 on XPC^{WT} cells

A- Relative protein expression, monitored by Western Blot, of Histones H2A.Z, H3, XPC, KAT2A, E2F1, BRD2 and TBP as well as levels of H2A.Zac and H3K9ac from whole cell and nuclear extracts from XP-C^{WT} cells treated with either DMSO or BRD2-inhibitors JQ1 and BIC1.

B- Relative mRNA expression of *CCND1*, before and after ATRA treatment in XP-C^{WT} cells previously treated with either DMSO or BRD2-inhibitors JQ1 and BIC1.

Publication 3

Xeroderma Pigmentosum Groups C and A in Algerian Patients with deregulation of both Transcription and DNA Repair.

N. Le May, N. Calmels, Y. Abiyad, L. Boukli, M. Semer, A. Serradj, J.M. Egly, V. Laugel

Résumé:

We described here the clinical features of two xeroderma pigmentosum patients having XPC and XPA mutations. Both mutations disturb the expression of the corresponding genes: while the XPC p.Val548Alafs*25 variant was not expressed due to RNA decay, the truncated XPA p.Arg228* variant was detected in the corresponding patients' cells. As a consequence of these mutations, Unscheduled DNA synthesis (UDS) and Recovery of RNA synthesis after DNA damage (RRS) assays as well as immunofluorescence on UV-irradiated patients' cells showed that the Nucleotide Excision Repair (NER) pathway was deficient. Moreover, we also found that the patients' cells were defective in transcription especially certain Retinoic-acid receptor (RAR) responsive genes. Altogether these DNA repair and transcriptional defaults define the molecular etiology for these two XP individuals helping to understand at least partially some of the patient's clinical features.

Xeroderma Pigmentosum Groups C and A in Algerian Patients with Deregulation of both Transcription and DNA Repair

Le May N^{1,2,3,4}, Calmels N^{5,6}, Abiayad Y⁷, Boukli L⁷, Semer M^{1,2,3,4}, Serradj A⁷, Egly JM^{*1,2,3,4} and Laugel V^{*5,6}

¹IGBMC, Department of Functional Genomics and Cancer, CNRS/INSERM/University of Strasbourg, Illkirch Cedex, CU Strasbourg, France

²Centre National de la Recherche Scientifique, Illkirch, France

³Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale, Illkirch, France

⁴Université de Strasbourg, Illkirch, France

⁵Department of Pediatric Neurology, Strasbourg University Hospital, Avenue Moliere, Strasbourg Cedex, France

⁶Laboratory of Medical Genetics, University of Strasbourg, Strasbourg, France

⁷Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran, Service de Dermatologie, Ibn Rochd, Oran, Algeria

***Corresponding author:** Le May N, IGBMC, Department of Functional Genomics and Cancer, CNRS/INSERM/University of Strasbourg, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, CU Strasbourg, France, Tel: 33388653450, E-mail: nlemay@igbmc.fr

***Co-Corresponding authors:** Egly JM, egly@igbmc.fr and Laugel V, Vincent.LAUGEL@chru-strasbourg.fr

Citation: Le May N, Calmels N, Abiayad Y, Boukli L, Semer M, et al. (2018) Xeroderma Pigmentosum Groups C and A in Algerian Patients with Deregulation of both Transcription and DNA Repair. J Case Rep Stud 6(4): 401

Received Date: June 04, 2018 **Accepted Date:** August 21, 2018 **Published Date:** August 23, 2018

Abstract

Xeroderma Pigmentosum (XP) is a rare autosomal recessive disorder characterized by an extreme sensitivity to UV rays from sunlight, a high incidence of skin cancer and occasional neurological symptoms. XP, primarily defined as a DNA repair syndrome, has been found associated with defects in the Nucleotide Excision Repair (NER) pathway, and more recently by transcriptional deregulation. XP results from mutations in eight genes (*XPA* to *XPG* and *XPV*) coding for proteins involved in NER.

We report here two cases of XP patients from Algeria, describe their clinical features, identify the causative mutations, and molecularly define their etiology. We determined that each XP individual bears *XPC* and *XPA* mutations respectively. Both mutations disrupt expression of their corresponding genes: while the *XPC* p.Val548Alafs*25 variant was not expressed, the truncated *XPA* p.Arg228* variant was detected in the patient's cells. Unscheduled DNA synthesis (UDS) and Recovery of RNA synthesis after DNA damage (RRS) assays, as well as immunofluorescence on Ultraviolet-irradiated patient cells showed deficiency in the NER pathway. Moreover, we also found that the patients' cells were defective in transcription, especially certain Retinoic-acid receptor (RAR)-responsive genes.

Altogether our data revealed both DNA repair and transcriptional defaults that defined the molecular etiology for these two XP individuals, and may help to understand some of the patients' clinical features.

Keywords: *Xeroderma pigmentosum*; Algerian Patients; DNA Repair; Nucleotide-Excision Repair; Transcription

List of abbreviations: XP: *Xeroderma pigmentosum*; NER: Nucleotide-Excision Repair; UDS: Unscheduled DNA Synthesis; RRS: Recovery of RNA Synthesis after DNA Damage; RAR: Retinoic-acid Receptor; CPD: Cyclobutane Pyrimidine Dimers; 6-4PP: 6-4 Photoproducts; GGR: Global Genome Repair; TCR: Transcription-Coupled Repair; NR: Nuclear Receptor; *RARβ2*: Retinoic Acid Receptor Isoform β2; CYP26: Cytochrome P450 Family 26; DAPK1: Death Associated Protein Kinase 1 (*DAPK1*); GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

Introduction

Xeroderma Pigmentosum (XP) is a rare autosomal recessive disorder. Complementation tests by cell fusion have shown the existence of at least seven XP complementation groups: XP-A to XP-G, corresponding to mutations on *XPA* to *XPG* genes, and a separate group variant (XP-V) related to mutations on the gene coding for DNA polymerase η [1]. The products of these genes are involved in Nucleotide Excision Repair (NER), the principal DNA repair pathway for removal of a variety of DNA damages induced by genotoxic attack such as Ultraviolet (UV) irradiation or anti-tumor drugs. XP has been found associated with defects in NER pathway.

This genetic disease is characterized by a wide variety of clinical features. XP patients present an extreme sensitivity to UV rays from sunlight. This condition mostly affects the eyes and areas of skin exposed to the sun and results in a high incidence of skin cancers (more than 1000-fold in comparison with normal individuals) as well as increased cancer susceptibility in many other tissues, including breast and lung. Approximately 30% of affected individuals have neurological symptoms, including acquired microcephaly and progressive cognitive impairment. These neurological disorders are often found in XP-A, XP-B, XP-D and XP-F groups associated with severe phenotypes, but are rare in the XP-C group. XP is rare in the United States and Europe (1/100000), but relatively more frequent in Japan (1/ 22000) and in North Africa (1/10000) due to the high rate of consanguinity (for example 29.8% in Tunisia) [2-5].

UV irradiation of human cells results in DNA damage, consisting primarily of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and 6-4 photoproducts (6-4PP) that can be eliminated through two sub-pathways of the NER: the global genome repair (GGR) removes DNA damage from the entire genome, whereas the transcription-coupled repair (TCR) corrects DNA lesions located on the actively transcribed strand which block elongating RNA polymerase II [6]. In GGR, the XPC-HR23B and UV-DDB complexes recognize the damage-induced DNA distortion. In TCR, RNA Pol II stalled in front of a lesion on the transcribed DNA strand initiates the recruitment of the TCR-specific sensors CSB and CSA. Both NER sub-pathways then recruit TFIIH, which unwinds the DNA via its ATPase/helicase activities; XPA and RPA facilitate expansion of the unwound DNA bubble around the damage. The endonucleases XPG and XPF-ERCC1 then promote removal of the damaged oligonucleotide, before the re-synthesis machinery fills in the DNA gap.

XP has been primarily defined as a DNA repair syndrome due to the inability of patient cells to eliminate DNA lesions via NER pathways. However, studies in the last decade suggested that some of their phenotypes may also stem from transcriptional deregulation [7]. Indeed, we have demonstrated that the NER factors XPC, CSB, XPA, RPA, XPG and ERCC1-XPF are recruited with the transcription machinery controlled by nuclear receptors (NR) such as retinoic-acid receptor (RAR), influencing local chromatin remodeling around responsive gene promoters [8]. Moreover, primary fibroblasts derived from XP patients bearing mutations on *XPC*, *XPA*, *XPG*, *XPF*, *XPB* and *XPB* also present transcriptional deregulation [9,10].

In this report, we describe the clinical features and identify the mutations of two XP-C and XP-A individuals from Algeria. We also determined how these mutations disrupt NER and deregulate expression of genes such as those responsive to RAR, explaining the molecular etiology for these XP patients.

Methodology

Patients

The XP-C patient, hereafter called EHU01, is a male Algerian born to first-cousin consanguineous parents. He is the second child of five siblings (Figure 1A). He showed bilateral conjunctivitis from 1 week of age and cutaneous photosensitivity from 8 months of age, with marked erythema in sun-exposed skin areas. Cutaneous symptoms later evolved to include lentigines, hypo-pigmented macules and eventually poikiloderma. Multiple actinic keratosis lesions, several basal cell carcinomas of the head and neck area and a botryomycoma of the neck had to be removed before the age of 18 years. Bilateral visual impairment due to corneal opacification was confirmed at age 10 with complete blindness of the right eye and severely impaired vision of the left eye. This patient showed no extra-cutaneous symptoms and no mental retardation at the time of his latest clinical assessment, at age 18.

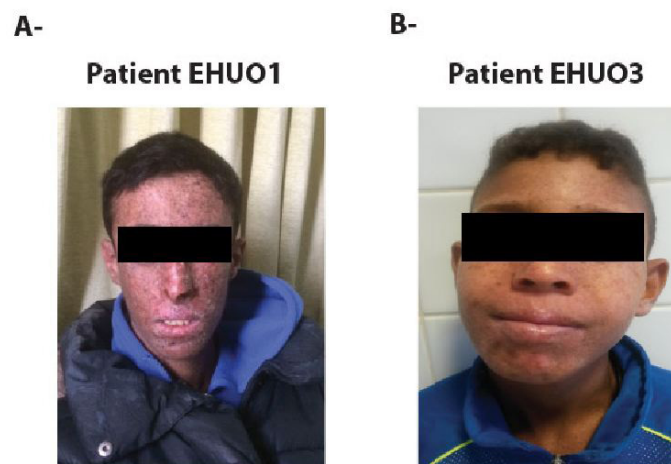


Figure 1: Algerian *Xeroderma pigmentosum* patients (A) Patient EHU01, at age of 19 years, had cutaneous symptoms later evolved to include lentigines, hypo-pigmented macules, multiple actinic keratosis lesions, several basal cell carcinomas of the head and neck area. He showed no extra-cutaneous symptom and no mental retardation at the time of his latest clinical assessment at age 18; (B) Patient EHU03, at age of 10 years, had cutaneous photosensitivity with marked erythema of sun-exposed areas. Cutaneous symptoms progressively included multiple lentigines, sclerodactyly and acrocyanosis together with mild sun-induced conjunctival hyperemia. Patient EHU03 showed moderate mental retardation. No skin tumor had developed at age 10

The XP-A patient, hereafter called EHUO3, is a male patient born to Algerian parents after an uneventful pregnancy (Figure 1B). No known consanguinity was reported in the family. Cutaneous photosensitivity was reported from the age of 7 months with marked erythema of sun-exposed areas. Hypo- and hyperpigmented macules were reported at age 1. Cutaneous symptoms progressively included multiple lentiginos, sclerodactyly and acrocyanosis, together with mild sun-induced conjunctival hyperemia. This patient shows moderate mental retardation. No skin tumor had developed at age 10.

Informed consent

Informed consent was obtained for all participants, including the parents of the children.

Cell lines and culture conditions

Primary fibroblast cultures were established from biopsies of unaffected skin obtained from the two XP individuals (EHUO1 and EHUO3) and their related mothers (EHUO2 and EHUO4). Fibroblasts were routinely grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (1g/L glucose) w/GLUTAMAX (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) supplemented with 10% of Fetal Calf Serum (FCS) and Penicillin (100 UI/mL) + Streptomycin (100 ug/mL).

Genomic DNA sequencing

Genomic DNA was extracted from fibroblast cultures using QIAamp DNA mini kit from QIAGEN. DNA samples from the two XP patients (EHUO1 and EHUO3) were studied by next-generation sequencing (NGS), targeting 16 genes of the NER pathway (*XPA* to *XPG* and *POLH* genes included) [11]. Briefly, libraries obtained by multiplex amplification were sequenced with Ion Personal Genome Machine (PGM, Life Technologies) using Ion 316 chip. Sequencing data were analyzed by the Torrent Suite v4.4 (Life Technologies). Subsequent variant annotation and ranking were performed using VaRank v1.4.0 (Geoffroy V et al, PeerJ. 2015) configured with Alamut Batch (Interactive biosoftware). *XPA* and *XPC* mutations identified by NGS were confirmed by Sanger DNA sequencing and familial segregation analyses were performed by the same assay on maternal samples (EHUO2 and EHUO4). The sequences of the primers used for amplifying the two *XPA* and *XPC* loci are indicated in Table 1. Sequences were obtained on a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using the Big Dye v1.1 sequencing standard kit (Life Technologies), aligned with the Sequencing Pilot software (JSI) and compared with the corresponding genomic DNA reference sequences (GRCh37; NM_000380.3 for *XPA* and NM_004628.4 for *XPC*).

Primers	Forward	Reverse
XPA (exon 6)	TGTACATGGCTGAAAGCTTGATGGAG	GCCAGGTGACCTTCACTGAAACTT
XPC (exon 9)	TGGCCCTCCAAAGCAGAGGAAA	ACCCAACATAGTGCTGGGCATA

Table 1: List of primers used in genomic DNA sequencing

XPC, XPA and RAR-target gene mRNA expression analysis

Total RNA was isolated from the different fibroblasts using a GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma) and reverse transcribed with SuperScript IV reverse transcriptase (Invitrogen). The quantitative PCR was done using QuantiTect SYBR green (QIAGEN) and the Lightcycler 480 (Roche). For the analysis of RAR-target genes, twelve hours before ligand treatment, cells were incubated with phenol red-free medium containing charcoal treated FCS and 40mg/ml gentamycin. Cells were then treated with 10µM all-trans retinoic acid (ATRA) (MP) for 6 hours. The primer sequences for the different genes used in qPCR are indicated in Table 2. The mRNA expression of the different analyzed genes was normalized to that of the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*).

Primers	Forward	Reverse
GAPDH_mRNA	AGCTCACTGGCATGGCCTTC	ACGCCTGCTTACCACCTTC
Hs_XPA_1_SG	QuantiTect Primer Assay (QIAGEN, QT00029519)	
Hs_XPC_1_SG	QuantiTect Primer Assay (QIAGEN, QT00080381)	
RARB2_mRNA	CCAGCAAGCCTCCATGTTC	TACACGCTCTGCACCTTTAGC
CYP26A1_mRNA	CGAGCACTCGTGGGAGAG	CCAAAGAGGAGTTCGGTTGA
DAPK1_mRNA	TGAGTGTGCCAGAAGCGAT	CAGGCCTGGGACATGTGCAT

Table 2: List of primers used in mRNA expression analysis

XPC and XPA protein expression analysis

Approximately 2×10^6 fibroblasts were plated in 10 cm plates (Falcon) and after 24 hours cells were washed, harvested, lysed in RIPA buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS) and incubated for 15

min at 4 °C before centrifugation. After denaturation, the protein samples were electrophoresed on polyacrylamide-SDS gels and transferred onto Hybond-C membrane. The blots were probed with antibodies against XPC, XPA and XPB. Detection was carried out with the chemiluminescence system (Pierce) and the Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

Recovery of RNA synthesis after DNA damage (RRS) assay

Cells were plated on coverslips in 6-well plates at a confluency of 7×10^4 cells per well. After 2 days, cells were irradiated with a range of UV-C doses, and then incubated for 23 hours with DMEM supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS). Cells were labelled with 5-ethynyl-uridine (EU; Invitrogen) for 2 hours, and then washed with PBS, followed by fixation, permeabilization and an azide-coupling reaction and DAPI staining (Click-iT RNA HCS Assay, Invitrogen). Finally, coverslips were washed in Phosphate Buffer Solution (PBS), and mounted on glass slides with Ibbidi Mounting Medium (Biovalley). Photographs of the cells were taken with a fluorescent microscope (Imager.Z2) equipped with a CCD camera (AxioCam, Zeiss). The images were processed and analyzed with ImageJ. At least 50 cells were randomly selected, and the average nuclear fluorescence intensity was calculated.

Unscheduled DNA synthesis (UDS) assay

Cells were plated on coverslips in 6-well plates at a confluency of 7×10^4 cells per well. After 2 days, cells were irradiated with a range of UV-C doses, and then incubated for 23 hours with DMEM supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS). Cells were labelled with 5-ethynyl-uridine (EU; Invitrogen) for 2 hours, and then washed with PBS, followed by fixation, permeabilization and an azide-coupling reaction and DAPI staining (Click-iT RNA HCS Assay, Invitrogen). Finally, coverslips were washed in Phosphate Buffer Solution (PBS), and mounted on glass slides with Ibbidi Mounting Medium (Biovalley). Photographs of the cells were taken with a fluorescent microscope (Imager.Z2) equipped with a CCD camera (AxioCam, Zeiss). The images were processed and analyzed with ImageJ. At least 50 cells were randomly selected, and the average nuclear fluorescence intensity was calculated.

Immunofluorescence

Approximately 2×10^5 fibroblasts were plated in Lab-tek chambered coverglass (Thermo scientific) and 24 hours later cells were washed, covered with an isopore polycarbonate filter with 5µm pores (EMD Millipore) and irradiated with a 254 nm UV-C lamp at 120J/m². 15 minutes after irradiation cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes, then washed with PBS and permeabilized with PBS 0.1% tritonX-100 for 10 minutes. DNA was denaturated with 10% HCl at room temperature (RT) for 20 minutes, and then cells were washed with PBS. Blocking and incubation with antibodies were performed in 10% heat inactivated FCS, washes were done with PBS 0.1% triton X-100. Nuclei were counterstained with DAPI and cells were mounted using the ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes). Microscopy pictures were taken at a TCS SP2 microscope (Leica) based on an inverted microscope (DMIRBE; Leica; 63x Plan Apochromat, NA 1.4; LCS software Leica), Z stack width was 0.5µm.

Antibodies

Antibodies against XPC (2076) were produced at the IGBMC. XPB (S-19) and XPA (FL-723) antibodies were purchased from Santa-Cruz Biotechnology. For immunofluorescence, antibodies against CPD (clone TDM-2 Cosmo Bio Co LTD), XPB (anti TFIIH p89 antibody, Santa Cruz Biotechnology, S-19), XPC (A301-122A, Bethyl), XPA (Ab-1, 2F15 from NeoMarkers) and secondary antibodies (Goat anti mouse alexa 488 and goat anti rabbit alexa 546 from Jackson Laboratories) were purchased.

Results

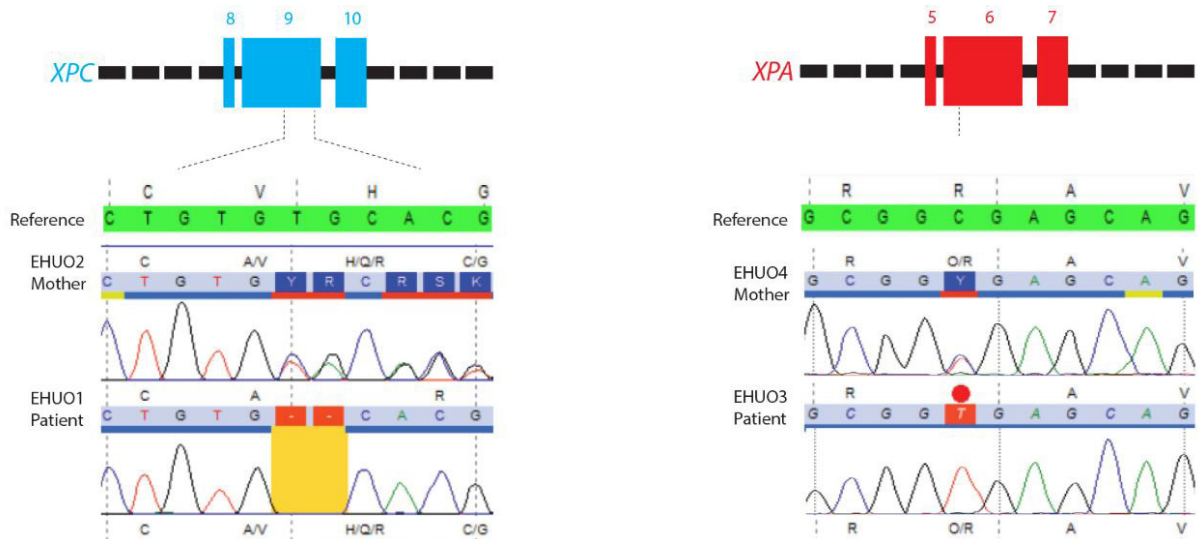
Identification of the XPC and XPA patient mutations

To pinpoint their genetic defects, genomic DNA from fibroblasts derived from the patients and the mothers were isolated. The two patients were homozygous for a single mutation each (Figure 2A). We identified one frameshift mutation (p.Val548Alafs*25) in XPC for the EHUO1 patient, due to a deletion (c.1643_1644delTG) on exon 9 (Figure 2A, left panel). The EHUO3 patient carried the nonsense mutation c.682C>T on exon 6 of XPA, leading to a premature termination at amino acid 228 (p.Arg228*) (Figure 2A, right panel). For both patients, their mother was heterozygous for the same mutation. Although the fathers' DNA was not available for analysis, it is presumed that they are also heterozygous carriers for these XPC and XPA mutations, which are often found in North Africa [4,12,13].

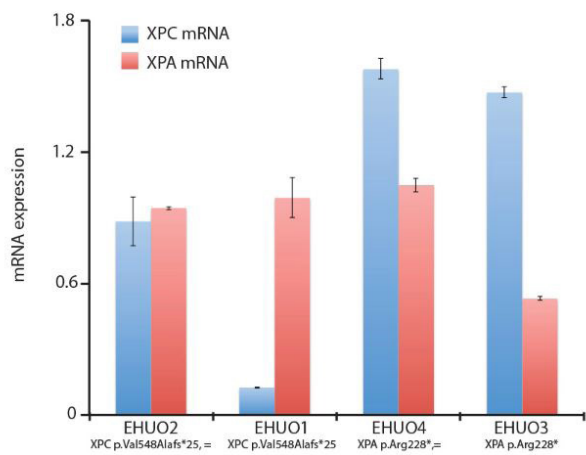
We next evaluated the consequences of these XPC and XPA mutations on the expression of corresponding transcripts and proteins. The EHUO1 fibroblasts had a strongly reduced level of XPC mRNA compared with the EHUO2 parental fibroblasts, and an absence of the protein (Figure 2B and 2C, lanes 1-2). In EHUO3 fibroblasts, a slight reduction of XPA mRNA was observed (Figure 2B). The expressed XPA protein was truncated with a molecular weight around 30kDa; this isoform was also detected within the heterozygous EHUO4 maternal cells (Figure 2C, lanes 3-4).

A-

	genotype			Variant
EHUO1 Patient	<i>XPC</i> (NM_004628.4):c.(1643_1644del);(1643_1644del)	Exon 9	Homozygote	p.(Val548Alafs*25)
EHUO2: Mother	<i>XPC</i> (NM_004628.4):c.(1643_1644del);(=)	Exon 9	Heterozygote	p.(Val548Alafs*25);(=)
EHUO3: Patient	<i>XPA</i> (NM_000380.3):c.(682C>T);(682C>T)	Exon 6	Homozygote	p.(Arg228*)
EHUO4: Mother	<i>XPA</i> (NM_000380.3):c.(682C>T);(=)	Exon 6	Heterozygote	p.(Arg228*);(=)



B-



C-

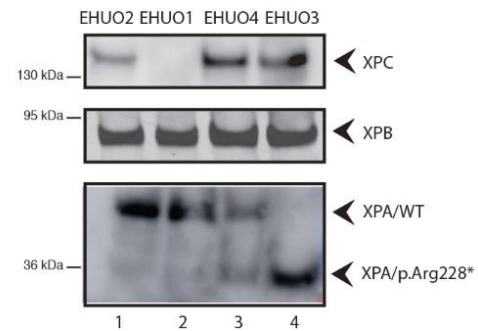


Figure 2: Mutations on *XPC* and *XPA* identified for the XP patients and occurrence on the related transcripts and proteins (A) Sequence of *XPC* in genomic DNA from fibroblasts derived from EHUO1 patient and EHUO2 mother and of *XPA* in genomic DNA from fibroblasts derived from EHUO3 patient and EHUO4 mother. The *XPC* variant for the EHUO1 patient was a frameshift mutation (p.Val548Alafs*25) due to deletion c.1643_1644delTG on *XPC* exon 9. His mother was heterozygous for the same mutation. The fibroblasts from the EHUO3 patient carried the nonsense mutation c.682C>T on the exon 6 of *XPA*, leading to a premature termination at amino acid 228 (p.Arg228*). His mother was heterozygous for the same mutation; (B) Relative mRNA expression of *XPC* and *XPA* in EHUO1, EHUO2, EHUO3 and EHUO4 fibroblasts; (C) Relative protein expression of *XPC*, *XPA* and *XPB* analysed by Western Blot from whole cell extract from EHUO1, EHUO2, EHUO3 and EHUO4 fibroblasts

UV irradiation sensitivity

We next performed the unscheduled DNA synthesis (UDS) assay to measure the ability of these different cells to perform GGR, using UV-C irradiation to create 6-4PP and CPD [14]. The fibroblasts from both patients and parents, as well as reference fibroblasts from an XP patient a normal individual, were submitted to increased doses of UV. EHUO1 and EHUO3 fibroblasts exhibited a very low UDS (with UDS levels comparable to the XP positive control; around 10% of the EHUO2 and EHUO4 maternal fibroblasts and control) (Figure 3A).

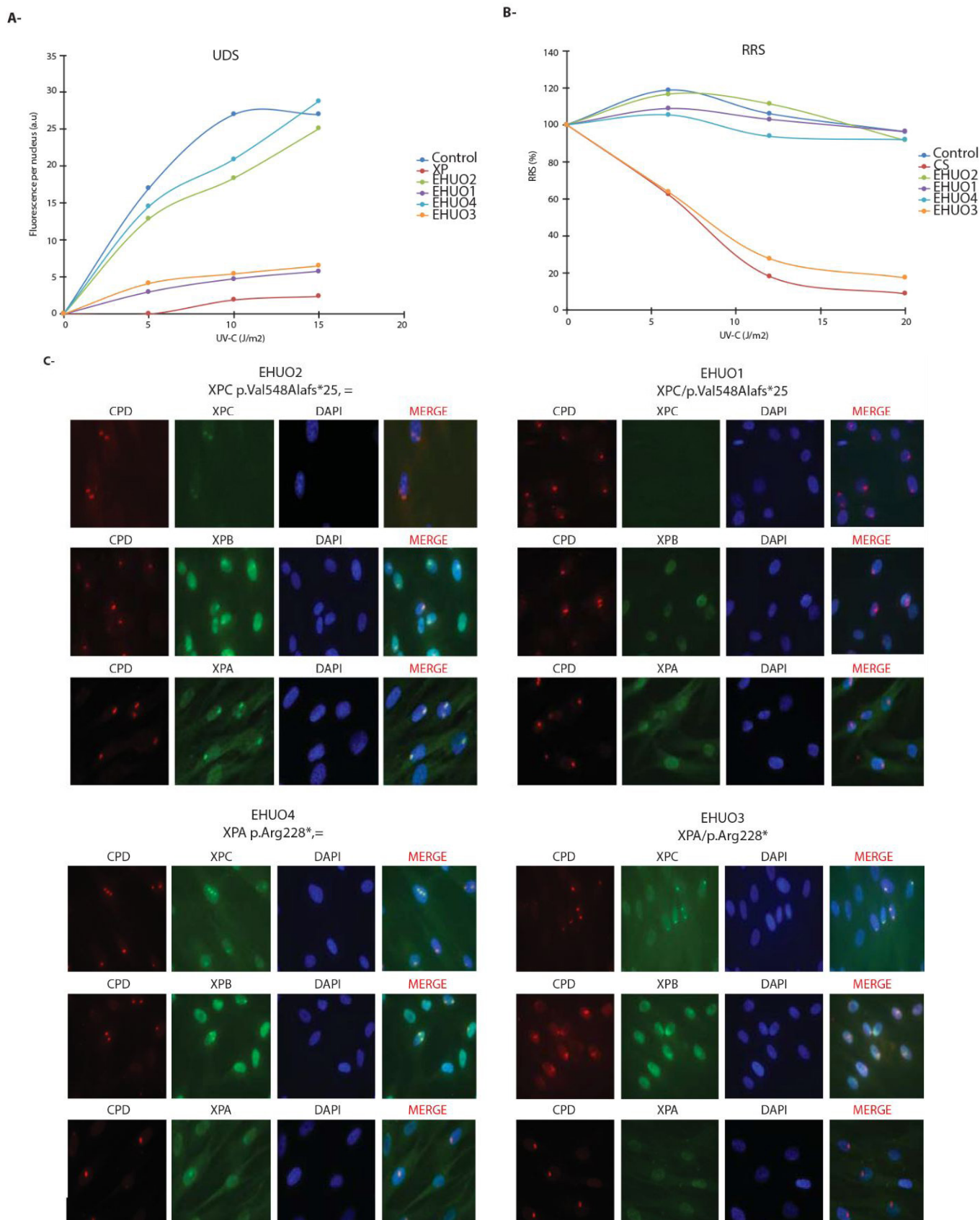


Figure 3: Consequences of *XPC* and *XPA* mutations on NER pathways; (A) GG-NER pathway analysis on control (dark blue circle), XP (red circle), EHUO1 (purple circle), EHUO2 (green circle), EHUO3 (blue circle) and EHUO4 (orange circle) fibroblasts measured by UDS assay; (B) TCR-NER pathway analysis on control (dark blue circle), CS (red circle), EHUO1 (purple circle), EHUO2 (green circle), EHUO3 (blue circle) and EHUO4 (orange circle) fibroblasts measured by RRS assay; (C) Recruitment of XPC, XPA and XPA to localized DNA damage (CPD) in EHUO1, EHUO2, EHUO3 and EHUO4 cells following UV irradiation. Cells were irradiated with a 254nm UV-C lamp at 120J/m² dose and 15 minutes after irradiation were fixed and immunofluorescent staining was carried out. While the CPD photoproducts were detected in both XP and maternal cells, the NER proteins were only co-localized in the parental fibroblasts

We also investigated TCR capacity of the patient fibroblasts by performing the recovery of RNA synthesis (RRS) assay upon UV irradiation. EHUO1 cells exhibited normal recovery of RNA synthesis, with similar levels to fibroblasts from parental EHUO2 and a normal individual (Figure 3B). However, the XPA-mutated EHUO3 cells failed to recover RNA synthesis after UV irradiation, just like the known TCR-deficient CS cells [15] (Figure 3B).

We next studied the dynamics of the NER factors in both XP-C and XP-A cells using localized UV irradiation combined with fluorescent immunostaining [16]. Confocal immunostaining showed that 15 minutes post UV irradiation, XPC co-localized with CPD in parental EHUO2 and EHUO4 cells, allowing the subsequent recruitment of XPB, a subunit of TFIIH, and XPA at the damaged sites (Figure 3C, upper panels). Compared to parental fibroblasts, the absence of XPC in cells derived from XP-C patient EHUO1 led to the loss of co-localization between CPD and either XPB or XPA, in line with previous studies showing the sequential recruitment of XPC, TFIIH, XPA, RPA, and finally XPG/XPF NER factors to DNA lesions [16,17]. In EHUO3 patient cells, the truncated XPA failed to recognize the CPD damage sites which had already recruited XPC and XPB/TFIIH, (Figure 3C, lower panels).

Altogether these results indicated that both XPC and XPA mutations cause defective NER in these patients.

Cells with XPC and XPA mutations have gene expression defects

Having previously demonstrated the involvement of NER factors in RAR-target gene expression, and that these genes are downregulated in cells derived from XP patients, we tested whether these XPC and XPA mutations also altered expression of

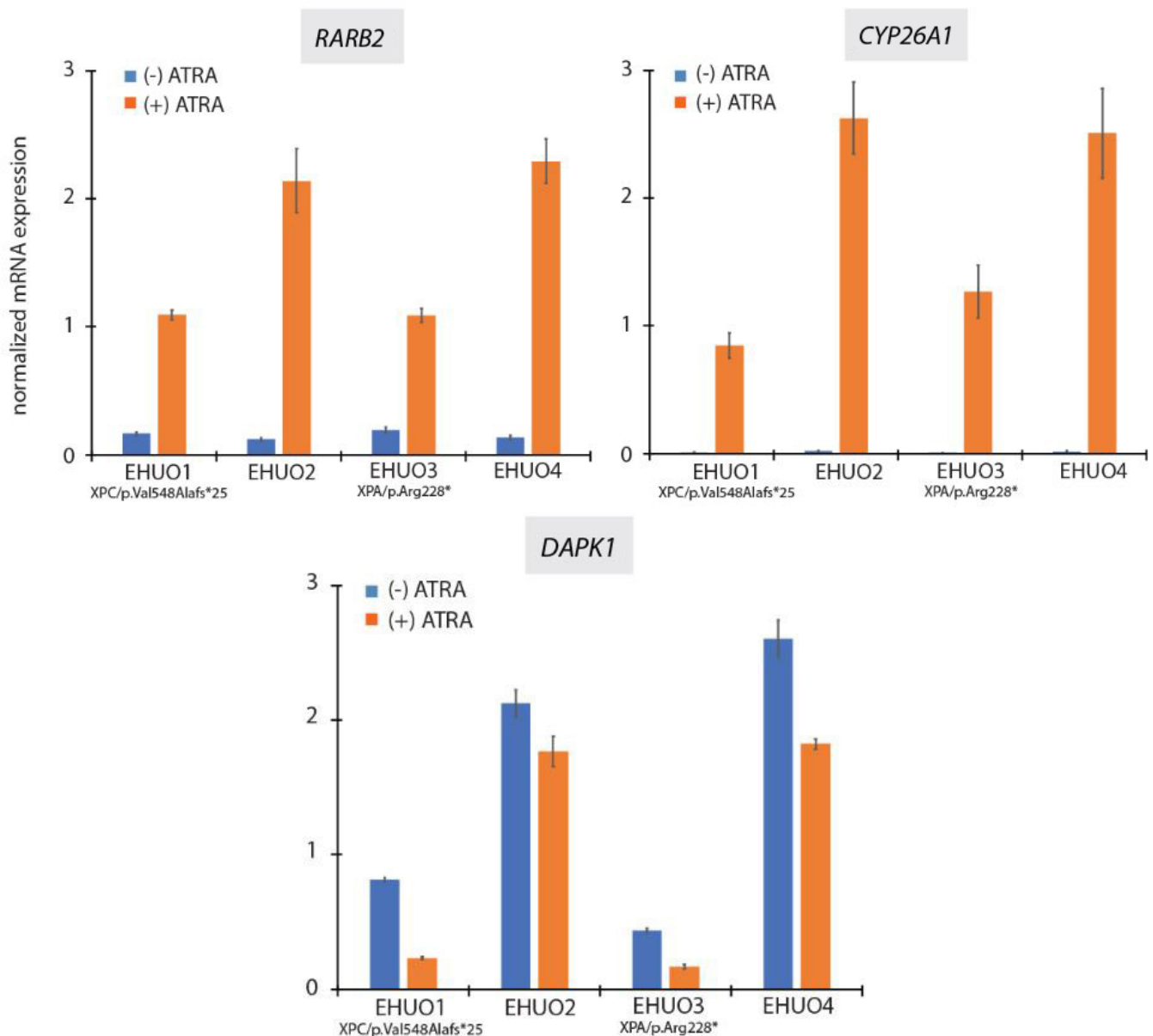


Figure 4: Consequences of XPC and XPA mutations on RAR-target genes transactivation
Relative mRNA expression of *RARB2*, *CYP26A1*, *DAPK1* genes in EHUO1, EHUO2, EHUO3 and EHUO4 fibroblasts, 6 hours after ATRA treatment. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments

these genes [18]. Upon ATRA treatment, we observed in the EHUO2 and EHUO4 parental fibroblasts transactivation of several RAR-target genes, including Retinoic acid receptor isoform $\beta 2$ (*RAR $\beta 2$*), cytochrome P450 family 26 (*CYP26*) (involved in cell proliferation and RA metabolism) and the tumor suppressor gene death associated protein kinase 1 (*DAPK1*) (Figure 4). Such ATRA-mediated induction was strongly decreased in XP-C EHUO1 and XP-A EHUO3 patient fibroblasts compared to the parental cells. We thus demonstrate a correlation between the identified *XPC* and *XPA* mutations and the deregulation of RAR-responsive genes.

Discussion

We described here the phenotype of two Algerian XP-C and XP-A patients originating from sun-exposed villages in the Oran city surroundings. The common *XPC* p.Val548Alafs variant present in the homozygous state in 87% of XP-C patients has been previously reported in patients mainly originating from North Africa [19,20]. The *XPA* p.Arg228* variant is present in 12% of XP-A patients worldwide, its frequency increasing to 87.5% in North Africa [13,21]. These patients exhibit extreme sensitivity to sunlight with some skin cancer development including melanocyte and keratinocyte malignancy, and eventually multiple basal cell carcinomas and invasive squamous cell carcinomas and melanomas [22]. The clinical features of these patients are linked to exposure to sunlight, and the complementation group and precise nature of the mutation. Some of the XP patients have neurological problems and intellectual deficiency that could be due to progressive neuronal degeneration, also resulting in sensorineural deafness, ataxia and microcephaly. Although most of the above clinical features may be explained by deficiencies in DNA repair, and more precisely in NER, as shown above, we also show here that there are defects in gene expression, illustrated by impaired induction of RAR-target genes. Retinoids maintain certain skin functions and have therefore been proposed as a treatment for skin problems, such as in topical anti-acne and anti-wrinkle agents. Beside these functions, retinoids are also involved in the regulation of a large set of genes. As an example, *CYP26* enzymes have a role in determining the cellular exposure to RA by metabolizing RA, and *DAPK1* acts as an inhibitor of RIG-I, signaling production of type I interferon and as a tumor suppressor, downregulated in multiple cancer types [23,24]. A defect in the expression of these genes might lead to detrimental consequences, which could explain some clinical features in these patients, which warrants further attention.

As well as describing the biological phenotype of these two patients due to their environmental and social situations, our report emphasized for the first time the dual molecular etiology of XP patients, demonstrating both transcriptional and DNA repair defects. The identification of genes and the pathways regulated by NER factors would help to (i) determine relevant markers for an early and specific diagnosis, and to (ii) anticipate/predict the cancer risk among the different symptoms.

Acknowledgements

We are grateful to F. Coin and E. Compe for fruitful discussions. We also are indebted to the IGBMC cell culture facilities. We thank Cathy Obringer and Géraldine Greff for their excellent technical support. This study was supported by l'Agence Nationale de Recherche (ANR-12-BSU8-0017-01), la Fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer (ARC n°SL220130607082), the Ligue contre Le cancer (CCIR-GE 2015). Maryssa Semer was supported by le prix d'encouragement à la recherche de la province Sud (Nouvelle Calédonie).

Statements

N.C, M.S, V.L, N.LM conducted experiments and analyzed data. Y.A, L.B, A.S conducted the survey. N.LM, J.M.E., A.S., V.L conceived the project, supervised the research and wrote the manuscript with input and editing from all the authors. N.LM submitted the study. Authors declare no conflict of interest and no competing interests.

References

1. Bootsma D, Kraemer KH, Cleaver JE, Hoeijmakers JHJ (2002) Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy In: The Genetic Basis of Human Cancer (2nd Edn) McGraw-Hill, USA.
2. Kleijer WJ, Laugel V, Berneburg M, Nardo T, Fawcett H, et al. (2008) Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair* 7: 744-50.
3. Hirai Y, Kodama Y, Moriwaki S, Noda A, Cullings HM, et al. (2006) Heterozygous individuals bearing a founder mutation in the *XPA* DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population. *Mutat Res* 601: 171-8.
4. Soufir N, Ged C, Bourillon A, Austerlitz F, Chemin C, et al. (2010) A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from north Africa. *J Invest Dermatol* 130: 1537-42.
5. Ben Halim N, Ben Alaya Bouafif N, Romdhane L, Kefi Ben Atig R, Chouchane I, et al. (2013) Consanguinity, endogamy, and genetic disorders in Tunisia. *J Community Genet* 4: 273-84.
6. Hanawalt PC, Spivak G (2008) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 958-70.
7. Compe E, Egly JM (2016) Nucleotide Excision Repair and Transcriptional Regulation: TFIIH and Beyond. *Annu Rev Biochem* 85: 265-90.
8. May NL, Egly JM, Coin F (2010) True lies: the double life of the nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair. *J Nucleic Acids* 10.4061/2010/616342.
9. Le May N, Fradin D, Iltis I, Bougnères P, Egly JM (2012) XPG and XPF endonucleases trigger chromatin looping and DNA demethylation for accurate expression of activated genes. *Mol Cell* 47: 622-32.

10. Singh A, Compe E, Le May N, Egly JM (2015) TFIIF Subunit Alterations Causing Xeroderma Pigmentosum and Trichothiodystrophy Specifically Disturb Several Steps during Transcription. *Am J Hum Genet* 96: 194-207.
11. Calmels N, Greff G, Obringer C, Kempf N, Gasnier C, et al. (2016) Uncommon nucleotide excision repair phenotypes revealed by targeted high-throughput sequencing. *Orphanet J Rare Dis* 11: 26.
12. Satokata I, Tanaka K, Miura N, Narita M, Mimaki T, et al. (1992) Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum. *Mutat Res* 273: 193-202.
13. Nishigori C, Zghal M, Yagi T, Imamura S, Komoun MR, et al. (1993) High prevalence of the point mutation in exon 6 of the xeroderma pigmentosum group A-complementing (XPAC) gene in xeroderma pigmentosum group A patients in Tunisia. *Am J Hum Genet* 53: 1001-6.
14. Kelly CM, Latimer JJ (2005) Unscheduled DNA synthesis: a functional assay for global genomic nucleotide excision repair. *Methods Mol Biol* 291: 303-20.
15. Mayne LV, Lehmann AR (1982) Failure of RNA synthesis to recover after UV radiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum. *Cancer Res* 42: 1473-8.
16. Volker M, Moné MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, et al. (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* 8: 213-24.
17. Riedl T, Hanaoka F, Egly JM (2003) The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J* 22: 5293-303.
18. Le May N, Mota-Fernandes D, Vélez-Cruz R, Iltis I, Biard D, et al. (2010) NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol Cell* 38: 54-66.
19. Khan SG, Oh KS, Shahlavi T, Ueda T, Busch DB, et al. (2006) Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of xeroderma pigmentosum patients. *Carcinogenesis* 27: 84-9.
20. Li L, Bales ES, Peterson CA, Legerski RJ (1993) Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group C. *Nat Genet* 5: 413-7.
21. Cleaver JE, Thompson LH, Richardson AS, States JC (1999) A summary of mutations in the UV-sensitive disorders: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy. *Hum Mutat* 14: 9-22.
22. Benhamou S, Sarasin A (2000) Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat Res* 462: 149-58.
23. Willemsen J, Wicht O, Wolanski JC, Baur N, Bastian S, et al. (2017) Phosphorylation-Dependent Feedback Inhibition of RIG-I by DAPK1 Identified by Kinome-wide siRNA Screening. *Mol Cell* 65: 403-15.
24. Kissil JL, Feinstein E, Cohen O, Jones PA, Tsai YC, et al. (1997) DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* 15: 403-7.

Submit your next manuscript to Annex Publishers and benefit from:

- ▶ Easy online submission process
- ▶ Rapid peer review process
- ▶ Online article availability soon after acceptance for Publication
- ▶ Open access: articles available free online
- ▶ More accessibility of the articles to the readers/researchers within the field
- ▶ Better discount on subsequent article submission

Submit your manuscript at

<http://www.annexpublishers.com/paper-submission.php>

Discussion

Discussion

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence un mécanisme impliquant le facteur de réparation de l'ADN, XPC, dans la régulation de la transcription. Nos différentes approches expérimentales ont permis d'identifier au niveau génomique les gènes et en particulier les promoteurs régulés par XPC ainsi que ses partenaires participant à ce mécanisme. Par ailleurs, nous avons montré qu'XPC était capable de réguler positivement et négativement environ 500 gènes dans le contexte du modèle RAR. Nos résultats nous ont permis d'identifier le complexe contenant XPC responsable de cette régulation positive et caractérisé par E2F1. En effet, nous montrons que XPC interagit avec KAT2A contenu dans le complexe ATAC, ainsi qu'avec le facteur de transcription E2F1, le facteur de remodelage de la chromatine BRD2 et le variant d'histone H2A.Z. Via KAT2A, ce complexe va acétyler non seulement H2A.Z mais également H3K9 au niveau des promoteurs. Dans un contexte pathologique caractérisé par l'absence de XPC et à l'origine de la maladie génétique XP-C, ce réseau d'interactions est fortement perturbé conduisant à l'absence du complexe sur les promoteurs et par conséquent à un défaut d'acétylation des histones. Cette dérégulation du remodelage de la chromatine est corrélée à un défaut du recrutement de l'ARN pol II ce qui va résulter en une baisse de la transcription des gènes associés (**Figure 20**).

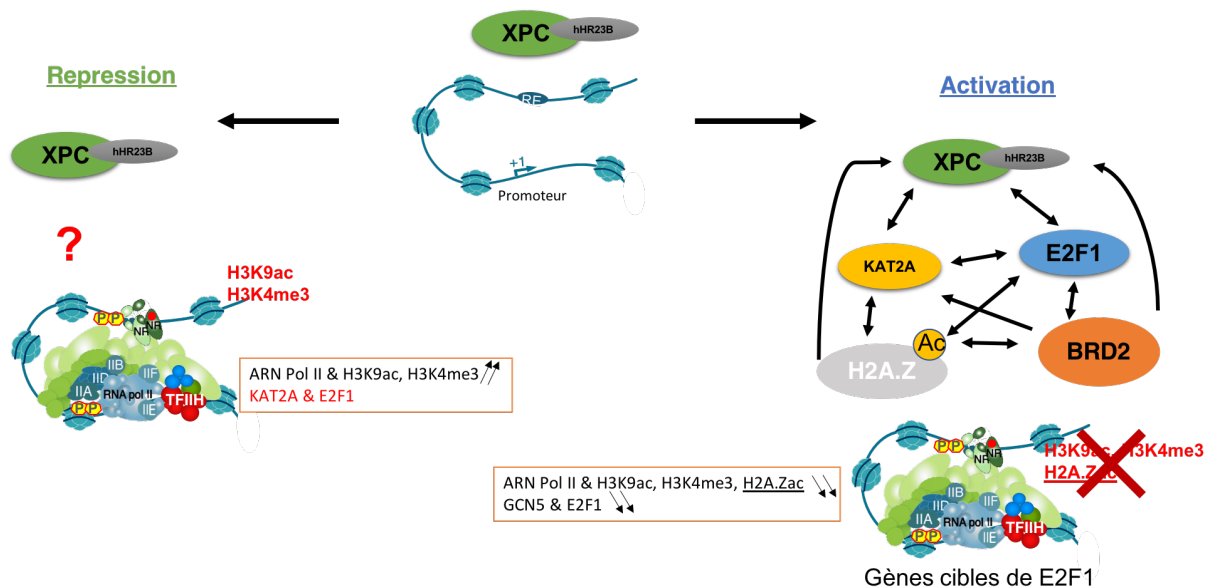


Figure 20 Schéma récapitulatif des résultats : XPC, KAT2A, E2F1 sont capable de former un complexe avec H2A.Z mais aussi BRD2. Ce complexe joue sur les PTMs des histones.

Par ailleurs, nous avons également étudié deux nouveaux patients XP en identifiant le défaut génétique : dans un cas XPC et dans l'autre XPA. Dans un second temps, nous avons caractérisé les défauts aussi bien en NER qu'en transcription.

A la lumière de ces travaux, l'ensemble de nos résultats soulève un certain nombre de questions que je vais développer ci-dessous.

✓ Nouveaux mécanismes transcriptionnels pour XPC

Pour comprendre le rôle de XPC en transcription, je me suis basé sur le modèle des gènes contrôlés par RAR. Bien que ce modèle soit très utile pour étudier les mécanismes moléculaires régulant la transcription, il ne reflète cependant pas le réel impact de XPC au niveau génomique et l'ensemble de ses fonctions. En effet, nous avons pu isoler finalement un nombre de gènes relativement faible (environ 500 gènes) directement régulés par XPC, certains étant activés et d'autres réprimés par le facteur NER alors que plus de mille autres gènes sont ciblés par XPC mais dont l'expression est régulée indépendamment. Le travail présenté dans cette thèse a permis de montrer comment XPC régule positivement un sous-ensemble de gènes caractérisés par la signature E2F1 et impliquant le complexe avec KAT2A, BRD2, E2F1 et H2A.Z. Nous n'avons pas étudié les mécanismes impliquant XPC dans la répression du second sous-ensemble de gènes mais nous pouvons affirmer que c'est indépendant des complexes participant à l'activation. De plus, nous nous sommes concentré sur l'étude des promoteurs ciblés par XPC mais nous savons et il a été montré que ce facteur NER peut aussi être présent au niveau des enhancers. XPC y joue-t'il des rôles semblables qu'au niveau des promoteurs ou assure-t-il d'autres fonctions? En effet, il a été montré que XPC peut réguler la déméthylation de l'ADN via TDG au niveau des enhancers des gènes régulant la pluripotence des cellules ES (Fong et al., 2011). Nous avons également des résultats allant dans ce sens concernant le gène RARB2 montrant que la présence de XPC est un pré-requis pour le recrutement de XPF et XPG ainsi que l'induction de coupures et la déméthylation active de l'ADN au niveau du promoteur et du terminateur. Nous ne savons pas s'il s'agit d'un rôle direct de XPC ou une conséquence de la présence de XPG et XPF. En résumé, les modèles cellulaires et géniques choisis représentent d'importantes limites pour estimer le réel impact et les mécanismes impliquant XPC en transcription. Nos résultats indiquent que XPC finalement serait une plateforme de recrutement pour un certain nombre de cofacteurs dont E2F1, KAT2A/ATAC et BRD2. Nous avons aussi constaté que XPC n'influçait pas l'activité enzymatique de KAT2A. Nous nous sommes alors demandé s'il ne manquait pas dans notre système un élément important pour assurer une telle fonction. Connaissant l'importante relation physique et fonctionnelle entre XPC et TFIIH en GG-NER, nous avons ainsi testé l'impact de TFIIH et nos résultats préliminaires ont montré que TFIIH via CDK7 serait capable de stimuler l'activité HAT de KAT2A dans un système in vitro. Ces

observations peuvent laisser penser que ce mécanisme dépendant de XPC est loin d'être complètement défini. En effet, l'analyse protéomique des complexes contenant XPC a permis l'identification d'autres partenaires notamment des TAFs contenus dans les complexes TFIIID et SAGA, ainsi que l'HMT NSD3. Ces protéines sont particulièrement intéressantes dans leurs éventuelles implications dans le mode de recrutement de XPC au niveau des promoteurs et la régulation d'autres histones PTMs comme H3K36me3 associée à l'élongation de la transcription et dépendante de NSD3.

✓ Mécanismes conservés en NER

Au-delà de ce rôle dans la régulation du remodelage de la chromatine en transcription, XPC est aussi important pour la GG-NER dans la reconnaissance du dommage. Au vue de la dualité fonctionnelle du complexe TFIIH impliquant des fonctions bien spécifiques en transcription et en NER et d'autres communes, une question à se poser est de savoir si les mécanismes impliquant XPC et le complexe KAT2A/E2F1/BRD2/H2A.Z participent également à la réparation de l'ADN. Des études ont ainsi montré que KAT2A et E2F1 via XPC régulent H3K9ac autour du dommage au début de la GG-NER (Guo et al., 2010, 2011b). Nous avons également montré par CHIP/WB (**Figure 21**) qu'il était possible d'isoler un complexe comportant XPC, TFIIH, KAT2A, E2F1 associé à H3K9ac à partir de chromatine issue de cellules irradiées par des UVs. Il est par ailleurs intéressant de noter que ce complexe est détectable uniquement 15 min post-irradiation suggérant le côté transitoire de cette étape. Enfin, il a été montré que le variant H2A.Z n'était pas détecté autour des dommages réparés par la voie NER. L'ensemble de ces informations suggère par conséquent que certains mécanismes régulés par XPC participent en transcription et en NER (KAT2A et E2F1) alors que d'autres semblent être spécifiques. Tout comme l'intervention de XPC en transcription, il est étonnant de constater le rôle de E2F1 en NER et en réparation plus globalement sachant son rôle de facteur de transcription via des séquences spécifiques au niveau des promoteurs de gènes régulant le cycle cellulaire. Est-ce une manière différente d'assurer le maintien du cycle cellulaire en bloquant son arrêt via l'élimination des dommages? Comment E2F1 est-il recruté au niveau de dommage sachant qu'il n'y a pas de séquences spécifiques liées au dommage? Il a été montré que le E2F1 est phosphorylé lorsqu'il participe à la réparation via la DDR mais son mode de recrutement reste mal compris. On peut supposer que son interaction avec XPC et HR23B soit une des voies possibles.

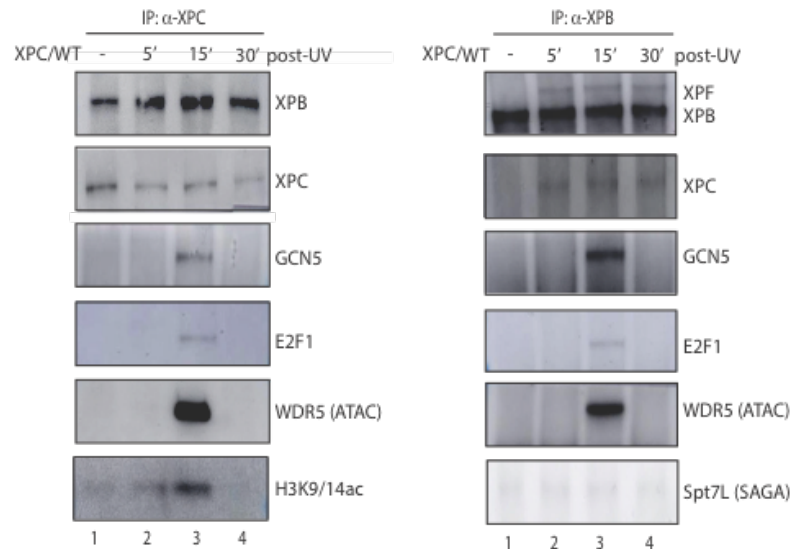


Figure 21 KAT2A et E2F1 se retrouvent associés à la GG-NER: En prenant compte la dualité fonctionnelle de XPC dans la transcription et la réparation de l'ADN, nous avons déterminé la présence de complexes contenant GCN5 dans la GG-NER après irradiation aux UVCs. Nous avons donc analysé le complexe de pré-incision GG-NER (Pinc) par CHIP / Western blot. Nous avons étudié le recrutement de GCN5, SAGA et ATAC avec XPC, XPF et TFIIH à la chromatine dans des cellules XPC^{WT} irradiées UVC récoltées 5, 15 et 30 minutes après irradiation. Le Pinc de GG-NER a été analysé par immunoprécipitation de XPB ou de XPC à partir de chromatine irradiée aux UVC. Comme prévu, l'IP-XPB a montré l'arrivée de XPC et de XPF avec le départ concomitant des sous-unités CDK7 de TFIIH et de la cycline H après irradiation. De manière intéressante, nous avons également observé une arrivée transitoire des sous-unités GCN5 et WDR5 (ATAC) mais pas de sous-unités SAGA à 15 minutes d'irradiation post-UV. Une détection transitoire similaire à 15 min d'irradiation post-UV des sous-unités GCN5 et ATAC a été détectée sur XPC-IP en même temps que l'accumulation de H3K9 / 14ac (Matériel et méthode en annexe).

✓ Contextes des patients XP-C

Bien qu'il soit difficile de corréliser les défauts transcriptionnels des gènes contrôlés par RAR et XPC avec les phénotypes des patients XP, ces découvertes permettent néanmoins d'affirmer qu'au-delà de son statut de syndrome de la réparation de l'ADN, XP est aussi un syndrome de la transcription dont les conséquences restent cependant mal comprises. Nos résultats concernant le rôle de XPC en transcription doivent être considérés comme des outils qui pourront nous aider à moyen terme à découvrir des marqueurs pertinents pour mieux caractériser et anticiper les symptômes des patients voire envisager des approches thérapeutiques en ciblant les mécanismes identifiés. Malgré le manque de pertinence du modèle RAR, il est tout de même important de souligner que notre étude des patients XP-C et XP-A a montré que les gènes régulés XPC que nous avons identifiés notamment DAPK1 sont sous-exprimés dans les cellules issues de ces patients et traitées à l'ATRA. N'oublions pas également que les tests RRS et UDS couramment utilisés pour caractériser la NER chez les patients s'appuient sur des conditions peu physiologiques à partir des fibroblastes issues de biopsies de peaux (comme pour nos approches) irradiées par des UVs. En ce qui concerne la

découverte de marqueurs pour le défaut transcriptionnel, une première solution serait d'utiliser des modèles cellulaires plus pertinents notamment par rapport au phénotype des patients XP. Ainsi, nous avons débuté récemment le développement de kératinocytes modifiés par CRISPR/CAS9 pour insérer des tags pour XPC ainsi que les mutations isolées chez les patients XP-C. Une autre possibilité serait, dans le cadre de notre collaboration avec les médecins et les familles de patients XP, d'obtenir des échantillons de tissus sain et cancéreux. Enfin, il existe un modèle souris invalidé pour xpc qui ne reflète certes pas XP chez l'humain mais qui pourrait s'avérer très utile. Le mécanisme impliquant XPC dans le remodelage de la chromatine en transcription a permis d'identifier des co-facteurs très souvent associés à des pathologies notamment cancéreuses comme l'axe H2A.Z/BRD2/E2F1 pour les mélanomes (Vardabasso et al., 2015). Il serait par exemple judicieux d'évaluer l'impact de cet axe dans le cadre des cancers de la peau développés par les patients XP. Des inhibiteurs de BRD comme ceux utilisés dans nos travaux ont prouvé leurs forts potentiels en tant qu'anti-cancéreux suggérant que les résultats présentés dans cette thèse nous indiquent une voie intéressante à poursuivre pour identifier les marqueurs importants caractérisant des maladies rares comme XP mais plus généralement les cancers.

Annexes

Annexes

Matériel et méthode figure 21:

ChIP / Western blot sur des cellules irradiées aux UVs

Les cellules XPCWT ont étéensemencées (106 cellules par boîte) 24h avant l'expérience, ont été rincées avec du PBS et irradiées avec des UVs (20 J/m²). Les cellules ont été crosslinkées à température ambiante pendant 30 minutes avec du formaldéhyde à 1% aux temps d'irradiation post-UV indiqués et la chromatine a été préparée (Fousteri et al., 2006). Le ChIP/Western blot, en utilisant des anticorps XPB ou GFP, a été réalisée comme décrit précédemment (Coin et al., 2008). Brièvement, la chromatine a été soniquée dans du tampon S (Tris-HCl 10 mM [pH 8,0], NaCl 140 mM, Triton X-100 à 1%, Na-déoxycholate 0,1%, SDS 0,1%) en utilisant le Qsonica Q800R, avec 20s on et 40s off. Les échantillons ont été centrifugés (13 000 tr / min, 15 min) et le surnageant qui contenait la chromatine crosslinkées a été stocké à -80 ° C. Dans chaque dosage, 600 ug de protéine provenant de la chromatine crosslinkées ont été immunoprécipités avec 1 ug d'anticorps dans du tampon S pendant 4 h à 4 ° C. Les immunocomplexes ont été recueillis sur des billes de protéine G Sepharose (Upstate, Billerica, MA) pendant une nuit à 4 ° C. Les billes ont ensuite été lavées trois fois avec 5 volumes de tampon S et remises en suspension dans du tampon SDS 1X Laemmli. Les échantillons ont été incubés à 95 ° C pendant 90 minutes pour l'inversion du crosslink avant l'électrophorèse.

Références

Références

A

- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M.K., Vilpo, J.A., Moncollin, V., Podust, V.N., Protić, M., Hübscher, U., Egly, J.M., and Wood, R.D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 80, 859–868.
- Ahn, S.H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol. Cell* 13, 67–76.
- Alekseev, S., Nagy, Z., Sandoz, J., Weiss, A., Egly, J.-M., Le May, N., and Coin, F. (2017). Transcription without XPB Establishes a Unified Helicase-Independent Mechanism of Promoter Opening in Eukaryotic Gene Expression. *Mol. Cell* 65, 504–514.e4.
- Alsayed, Y., Uddin, S., Mahmud, N., Lekmine, F., Kalvakolanu, D.V., Minucci, S., Bokoch, G., and Platanias, L.C. (2001). Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. *J. Biol. Chem.* 276, 4012–4019.
- Andressoo, J.-O., Hoeijmakers, J.H.J., and de Waard, H. (2005). Nucleotide excision repair and its connection with cancer and ageing. *Adv. Exp. Med. Biol.* 570, 45–83.
- Anttinen, A., Koulu, L., Nikoskelainen, E., Portin, R., Kurki, T., Erkinjuntti, M., Jaspers, N.G.J., Raams, A., Green, M.H.L., Lehmann, A.R., et al. (2008). Neurological symptoms and natural course of xeroderma pigmentosum. *Brain* 131, 1979–1989.
- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugasawa, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. (2001). Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 276, 18665–18672.
- Arents, G., and Moudrianakis, E.N. (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.
- Armache, K.-J., Kettenberger, H., and Cramer, P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6964–6968.
- Aso, T., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1994). Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters. *J. Biol. Chem.* 269, 26575–26583.
- Avvakumov, N., Nourani, A., and Côté, J. (2011). Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol. Cell* 41, 502–514.

B

- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641–643.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.
- Barbieri, I., Cannizzaro, E., and Dawson, M.A. (2013). Bromodomains as therapeutic targets in cancer. *Brief. Funct. Genomics* 12, 219–230.
- Barreto, G., Schäfer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S.K., Handa, V., Döderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., et al. (2007). Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671–675.
- Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1–16.
- Beard, P. (1978). Mobility of histones on the chromosome of simian virus 40. *Cell* 15, 955–967.
- Bengal, E., Flores, O., Krauskopf, A., Reinberg, D., and Aloni, Y. (1991). Role of the

mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 1195–1206.

Bernardes de Jesus, B.M., Bjørås, M., Coin, F., and Egly, J.M. (2008). Dissection of the molecular defects caused by pathogenic mutations in the DNA repair factor XPC. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 7225–7235.

Binda, O. (2013). On your histone mark, SET, methylate! *Epigenetics* *8*, 457–463.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* *16*, 6–21.

Birse, C.E., Minvielle-Sebastia, L., Lee, B.A., Keller, W., and Proudfoot, N.J. (1998). Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast. *Science* *280*, 298–301.

Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S., and Hanawalt, P.C. (1985). DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* *40*, 359–369.

Bour, G., Gaillard, E., Bruck, N., Lalevée, S., Plassat, J.-L., Busso, D., Samama, J.-P., and Rochette-Egly, C. (2005). Cyclin H binding to the RARalpha activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16608–16613.

Bradford, P.T., Goldstein, A.M., Tamura, D., Khan, S.G., Ueda, T., Boyle, J., Oh, K.-S., Imoto, K., Inui, H., Moriwaki, S.-I., et al. (2011). Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *J. Med. Genet.* *48*, 168–176.

Bradsher, J., Auriol, J., Proietti de Santis, L., Iben, S., Vonesch, J.L., Grummt, I., and Egly, J.M. (2002). CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol. Cell* *10*, 819–829.

Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* *84*, 843–851.

Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., de Thé, H., and Rochette-Egly, C. (2009). A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *EMBO J.* *28*, 34–47.

Budhu, A.S., and Noy, N. (2002). Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 2632–2641.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* *56*, 549–561.

Burke, T.W., and Kadonaga, J.T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* *11*, 3020–3031.

Burley, S.K., and Roeder, R.G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* *65*, 769–799.

Buschbeck, M., and Hake, S.B. (2017). Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 299–314.

Butler, J.E.F., and Kadonaga, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* *16*, 2583–2592.

C

Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C.A.M., Taylor, M.S., Engström, P.G., Frith, M.C., et al. (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat. Genet.* *38*, 626–635.

Cedar, H., and Bergman, Y. (2012). Programming of DNA methylation patterns. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 97–117.

Chalkley, G.E., and Verrijzer, C.P. (1999). DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* *18*, 4835–4845.

Chambers, R.S., Wang, B.Q., Burton, Z.F., and Dahmus, M.E. (1995). The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB. *J. Biol. Chem.* *270*, 14962–14969.

Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *10*, 940–954.

Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* *318*, 444–447.

Cho, E.J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J., and Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev.* *15*, 3319–3329.

Citterio, E., Rademakers, S., van der Horst, G.T., van Gool, A.J., Hoeijmakers, J.H., and Vermeulen, W. (1998). Biochemical and biological characterization of wild-type and ATPase-deficient Cockayne syndrome B repair protein. *J. Biol. Chem.* *273*, 11844–11851.

Clayton, A.L., and Mahadevan, L.C. (2003). MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett.* *546*, 51–58.

Coin, F., Bergmann, E., Tremeau-Bravard, A., and Egly, J.M. (1999). Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. *EMBO J.* *18*, 1357–1366.

Coin, F., Proietti De Santis, L., Nardo, T., Zlobinskaya, O., Stefanini, M., and Egly, J.-M. (2006). p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit. *Mol. Cell* *21*, 215–226.

Coin, F., Oksenysh, V., Mocquet, V., Groh, S., Blattner, C., and Egly, J.M. (2008). Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Mol. Cell* *31*, 9–20.

Compe, E., and Egly, J.-M. (2012). TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 343–354.

Compe, E., Drané, P., Laurent, C., Diderich, K., Braun, C., Hoeijmakers, J.H.J., and Egly, J.-M. (2005). Dysregulation of the peroxisome proliferator-activated receptor target genes by XPD mutations. *Mol. Cell Biol.* *25*, 6065–6076.

Compe, E., Malerba, M., Soler, L., Marescaux, J., Borrelli, E., and Egly, J.-M. (2007). Neurological defects in trichothiodystrophy reveal a coactivator function of TFIIH. *Nat. Neurosci.* *10*, 1414–1422.

Cook, P.R. (2003). Nongenic transcription, gene regulation and action at a distance. *J. Cell Sci.* *116*, 4483–4491.

Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P., Kedinger, C., and Chambon, P. (1980). Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* *209*, 1406–1414.

Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R., and Kornberg, R.D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* *288*, 640–649.

Cramer, P., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* *292*, 1863–1876.

Crovato, F., Borrone, C., and Reboria, A. (1983). Trichothiodystrophy--BIDS, IBIDS and PIBIDS? *Br. J. Dermatol.* *108*, 247.

Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., et al. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* *118*, 545–553.

van Daal, A., and Elgin, S.C. (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell* *3*, 593–602.

D

Dahmus, M.E. (1995). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta* *1261*, 171–182.

Dawson, M.A., Bannister, A.J., Göttgens, B., Foster, S.D., Bartke, T., Green, A.R., and

- Kouzarides, T. (2009). JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* 461, 819–822.
- Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022.
- DeJong, J., and Roeder, R.G. (1993). A single cDNA, hTFIIA/alpha, encodes both the p35 and p19 subunits of human TFIIA. *Genes Dev.* 7, 2220–2234.
- Delva, L., Bastie, J.N., Rochette-Egly, C., Kraïba, R., Balitrand, N., Despouy, G., Chambon, P., and Chomienne, C. (1999). Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7158–7167.
- Deng, W., and Roberts, S.G.E. (2005). A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev.* 19, 2418–2423.
- Deng, W., Malecová, B., Oelgeschläger, T., and Roberts, S.G.E. (2009). TFIIB recognition elements control the TFIIA-NC2 axis in transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1389–1400.
- DiGiovanna, J.J., and Kraemer, K.H. (2012). Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J. Invest. Dermatol.* 132, 785–796.
- Dilworth, F.J., and Chambon, P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20, 3047–3054.
- Dollfus, H., Porto, F., Caussade, P., Speeg-Schatz, C., Sahel, J., Grosshans, E., Flament, J., and Sarasin, A. (2003). Ocular Manifestations in the Inherited DNA Repair Disorders. *Surv. Ophthalmol.* 48, 107–122.
- Doyon, Y., and Côté, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 147–154.
- Dryhurst, D., Thambirajah, A.A., and Ausió, J. (2004). New twists on H2A.Z: a histone variant with a controversial structural and functional past. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 82, 490–497.
- Duncan, D.S., McWilliam, P., Tighe, O., Parle-McDermott, A., and Croke, D.T. (2002). Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene* 21, 3253–3257.
- Duong, V., and Rochette-Egly, C. (2011). The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 1023–1031.
- Dyda, F., Klein, D.C., and Hickman, A.B. (2000). GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 81–103.

E

- Epanchintsev, A., Costanzo, F., Rauschendorf, M.-A., Caputo, M., Ye, T., Donnio, L.-M., Proietti-de-Santis, L., Coin, F., Laugel, V., and Egly, J.-M. (2017). Cockayne's Syndrome A and B Proteins Regulate Transcription Arrest after Genotoxic Stress by Promoting ATF3 Degradation. *Mol. Cell* 68, 1054-1066.e6.
- Evans, R., Fairley, J.A., and Roberts, S.G. (2001). Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB. *Genes Dev.* 15, 2945–2949.
- Eyboulet, F., Cibot, C., Eychenne, T., Neil, H., Alibert, O., Werner, M., and Soutourina, J. (2013). Mediator links transcription and DNA repair by facilitating Rad2/XPG recruitment. *Genes Dev.* 27, 2549–2562.

F

- Faghri, S., Tamura, D., Kraemer, K.H., and DiGiovanna, J.J. (2008). Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterises a wide spectrum of clinical manifestations. *J. Med. Genet.* 45, 609–621.

- Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Bardwell, L., Bardwell, A.J., Buratowski, S., Gulyas, K.D., Donahue, T.F., Friedberg, E.C., and Kornberg, R.D. (1993). Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell* 75, 1379–1387.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 172–183.
- Fitch, M.E., Nakajima, S., Yasui, A., and Ford, J.M. (2003). In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J. Biol. Chem.* 278, 46906–46910.
- Flaus, A., Rencurel, C., Ferreira, H., Wiechens, N., and Owen-Hughes, T. (2004). Sin mutations alter inherent nucleosome mobility. *EMBO J.* 23, 343–353.
- Flores, O., Lu, H., Killeen, M., Greenblatt, J., Burton, Z.F., and Reinberg, D. (1991). The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9999–10003.
- Fois, A., Balestri, P., Calvieri, S., Zampetti, M., Giustini, S., Stefanini, M., and Lagomarsini, P. (1988). Trichothiodystrophy without photosensitivity. Biochemical, ultrastructural and DNA repair studies. *Eur. J. Pediatr.* 147, 439–441.
- Fong, Y.W., Inouye, C., Yamaguchi, T., Cattoglio, C., Grubisic, I., and Tjian, R. (2011). A DNA repair complex functions as an Oct4/Sox2 coactivator in embryonic stem cells. *Cell* 147, 120–131.
- Fong, Y.W., Cattoglio, C., Yamaguchi, T., and Tjian, R. (2012). Transcriptional regulation by coactivators in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 22, 292–298.
- Fong, Y.W., Cattoglio, C., and Tjian, R. (2013). The intertwined roles of transcription and repair proteins. *Mol. Cell* 52, 291–302.
- Fousteri, M., and Mullenders, L.H.F. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 18, 73–84.
- Fousteri, M., Vermeulen, W., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H.F. (2006). Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol. Cell* 23, 471–482.
- Franklin, S.G., and Zweidler, A. (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* 266, 273–275.
- Friedberg, E.C., and Wood, R.D. (2007). New insights into the combined Cockayne/xeroderma pigmentosum complex: human XPG protein can function in transcription factor stability. *Mol. Cell* 26, 162–164.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P., and Kouzarides, T. (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* 278, 4035–4040.

G

- Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M., and Steinkühler, C. (2007). HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res.* 17, 195–211.
- Garrett, K.P., Serizawa, H., Hanley, J.P., Bradsher, J.N., Tsuboi, A., Arai, N., Yokota, T., Arai, K., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1992). The carboxyl terminus of RAP30 is similar in sequence to region 4 of bacterial sigma factors and is required for function. *J. Biol. Chem.* 267, 23942–23949.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 685–704.
- Gianni, M., Bauer, A., Garattini, E., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2002). Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation. *EMBO J.* 21, 3760–3769.
- Giglia-Mari, G., Coin, F., Ranish, J.A., Hoogstraten, D., Theil, A., Wijgers, N., Jaspers, N.G.J., Raams, A., Argentini, M., van der Spek, P.J., et al. (2004). A new, tenth subunit of

- TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat. Genet.* *36*, 714–719.
- Gillet, L.C.J., and Schäfer, O.D. (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* *106*, 253–276.
- Glickman, B.W., Schaaper, R.M., Haseltine, W.A., Dunn, R.L., and Brash, D.E. (1986). The C-C (6-4) UV photoproduct is mutagenic in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 6945–6949.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001a). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* *292*, 1876–1882.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001b). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* *292*, 1876–1882.
- Gozukara, E.M., Khan, S.G., Metin, A., Emmert, S., Busch, D.B., Shahlavi, T., Coleman, D.M., Miller, M., Chinsomboon, N., Stefanini, M., et al. (2001). A stop codon in xeroderma pigmentosum group C families in Turkey and Italy: molecular genetic evidence for a common ancestor. *J. Invest. Dermatol.* *117*, 197–204.
- Graham, J.M., Anyane-Yeboa, K., Raams, A., Appeldoorn, E., Kleijer, W.J., Garritsen, V.H., Busch, D., Edersheim, T.G., and Jaspers, N.G. (2001). Cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a nucleotide excision-repair defect and a mutated XPD gene, with prenatal diagnosis in a triplet pregnancy. *Am. J. Hum. Genet.* *69*, 291–300.
- Grant, P.A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., et al. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* *11*, 1640–1650.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., and Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* *113*, 357–367.
- Groisman, R., Kuraoka, I., Chevallier, O., Gaye, N., Magnaldo, T., Tanaka, K., Kisselev, A.F., Harel-Bellan, A., and Nakatani, Y. (2006). CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev.* *20*, 1429–1434.
- Grunstein, M., Hecht, A., Fisher-Adams, G., Wan, J., Mann, R.K., Strahl-Bolsinger, S., Laroche, T., and Gasser, S. (1995). The regulation of euchromatin and heterochromatin by histones in yeast. *J. Cell Sci. Suppl.* *19*, 29–36.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* *90*, 595–606.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G., and Song, H. (2011a). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* *145*, 423–434.
- Guo, R., Chen, J., Zhu, F., Biswas, A.K., Berton, T.R., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2010). E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* *285*, 19308–19315.
- Guo, R., Chen, J., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2011b). GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. *Nucleic Acids Res.* *39*, 1390–1397.

H

- Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR* *62*, 465–503.
- Hanawalt, P.C., and Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of

progress and surprises. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 958–970.

Hayashi, H., Nomoto, M., and Iwai, K. (1984). Tetrahymena histone H4. Complete amino acid sequences of two variants. *J. Biochem. (Tokyo)* 96, 1449–1456.

He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., et al. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303–1307.

Heller, E.R., Khan, S.G., Kuschal, C., Tamura, D., DiGiovanna, J.J., and Kraemer, K.H. (2015). Mutations in the TTDN1 Gene Are Associated with a Distinct Trichothiodystrophy Phenotype. *J. Invest. Dermatol.* 135, 734–741.

Hess, M.T., Schwitter, U., Petretta, M., Giese, B., and Naegeli, H. (1997). Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6664–6669.

Higa, L.A., Banks, D., Wu, M., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. (2006). L2DTL/CDT2 interacts with the CUL4/DDB1 complex and PCNA and regulates CDT1 proteolysis in response to DNA damage. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 1675–1680.

Hirose, Y., and Manley, J.L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* 14, 1415–1429.

Ho, J.J., Cattoglio, C., McSwiggen, D.T., Tjian, R., and Fong, Y.W. (2017). Regulation of DNA demethylation by the XPC DNA repair complex in somatic and pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 31, 830–844.

Hoeijmakers, J.H. (2001). DNA repair mechanisms. *Maturitas* 38, 17–22; discussion 22–23.

Holstege, F.C., van der Vliet, P.C., and Timmers, H.T. (1996). Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J.* 15, 1666–1677.

Hoogstraten, D., Bergink, S., Ng, J.M.Y., Verbiest, V.H.M., Luijsterburg, M.S., Geverts, B., Raams, A., Dinant, C., Hoeijmakers, J.H.J., Vermeulen, W., et al. (2008). Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *J. Cell Sci.* 121, 2850–2859.

Houzelstein, D., Bullock, S.L., Lynch, D.E., Grigorieva, E.F., Wilson, V.A., and Beddington, R.S.P. (2002). Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3794–3802.

Hua, S., Kallen, C.B., Dhar, R., Baquero, M.T., Mason, C.E., Russell, B.A., Shah, P.K., Liu, J., Khramtsov, A., Tretiakova, M.S., et al. (2008). Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Mol. Syst. Biol.* 4, 188.

I

Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozák, P., Egly, J.M., and Grummt, I. (2002). TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* 109, 297–306.

Iizuka, M., and Smith, M.M. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 154–160.

Illingworth, R.S., and Bird, A.P. (2009). CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* 583, 1713–1720.

Ito, S., Kuraoka, I., Chymkowitz, P., Compe, E., Takedachi, A., Ishigami, C., Coin, F., Egly, J.-M., and Tanaka, K. (2007). XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol. Cell* 26, 231–243.

Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–1303.

J

Jackson, J.D., and Gorovsky, M.A. (2000). Histone H2A.Z has a conserved function that is

distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic Acids Res.* *28*, 3811–3816.

Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* *79*, 107–117.

Jaspers, N.G.J., Raams, A., Silengo, M.C., Wijgers, N., Niedernhofer, L.J., Robinson, A.R., Giglia-Mari, G., Hoogstraten, D., Kleijer, W.J., Hoeijmakers, J.H.J., et al. (2007). First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. *Am. J. Hum. Genet.* *80*, 457–466.

Javahery, R., Khachi, A., Lo, K., Zenzie-Gregory, B., and Smale, S.T. (1994). DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 116–127.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074–1080.

Jin, Q., Yu, L.-R., Wang, L., Zhang, Z., Kasper, L.H., Lee, J.-E., Wang, C., Brindle, P.K., Dent, S.Y.R., and Ge, K. (2011). Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J.* *30*, 249–262.

Juven-Gershon, T., and Kadonaga, J.T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev. Biol.* *339*, 225–229.

K

Kamileri, I., Karakasilioti, I., Sideri, A., Kosteas, T., Tatarakis, A., Talianidis, I., and Garinis, G.A. (2012). Defective transcription initiation causes postnatal growth failure in a mouse model of nucleotide excision repair (NER) progeria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 2995–3000.

Kang, M.E., and Dahmus, M.E. (1995). The unique C-terminal domain of RNA polymerase II and its role in transcription. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* *71*, 41–77.

Kapetanaki, M.G., Guerrero-Santoro, J., Bisi, D.C., Hsieh, C.L., Rapić-Otrin, V., and Levine, A.S. (2006). The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2588–2593.

Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* *83*, 859–869.

Keeney, S., Chang, G.J., and Linn, S. (1993). Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E. *J. Biol. Chem.* *268*, 21293–21300.

Keogh, M.-C., Mennella, T.A., Sawa, C., Berthelet, S., Krogan, N.J., Wolek, A., Podolny, V., Carpenter, L.R., Greenblatt, J.F., Baetz, K., et al. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4. *Genes Dev.* *20*, 660–665.

Keriel, A., Stary, A., Sarasin, A., Rochette-Egly, C., and Egly, J.M. (2002). XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha. *Cell* *109*, 125–135.

Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J., and Cedar, H. (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* *44*, 535–543.

Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* *116*, 259–272.

Khorasanizadeh, S., and Rastinejad, F. (2001). Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 384–390.

Kim, J.K., Patel, D., and Choi, B.S. (1995). Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem. Photobiol.* *62*, 44–50.

Kleijer, W.J., Laugel, V., Berneburg, M., Nardo, T., Fawcett, H., Gratchev, A., Jaspers, N.G.J., Sarasin, A., Stefanini, M., and Lehmann, A.R. (2008). Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and

trichothiodystrophy. *DNA Repair* 7, 744–750.

Kobor, M.S., Simon, L.D., Omichinski, J., Zhong, G., Archambault, J., and Greenblatt, J. (2000). A motif shared by TFIIF and TFIIB mediates their interaction with the RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphatase Fcp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7438–7449.

Koch, S., Garcia Gonzalez, O., Assfalg, R., Schelling, A., Schäfer, P., Scharffetter-Kochanek, K., and Iben, S. (2014). Cockayne syndrome protein A is a transcription factor of RNA polymerase I and stimulates ribosomal biogenesis and growth. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 2029–2037.

Koob, M., Laugel, V., Durand, M., Fothergill, H., Dalloz, C., Sauvanaud, F., Dollfus, H., Namer, I.J., and Dietemann, J.-L. (2010). Neuroimaging in Cockayne syndrome. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 31, 1623–1630.

Kornberg, R.D. (1977). Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 931–954.

Kornberg, R.D. (1999). Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol.* 9, M46-49.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.

Kraemer, K.H., Levy, D.D., Parris, C.N., Gozukara, E.M., Moriwaki, S., Adelberg, S., and Seidman, M.M. (1994). Xeroderma Pigmentosum and Related Disorders: Examining the Linkage Between Defective DNA Repair and Cancer. *J. Invest. Dermatol.* 103, S96–S101.

Kraemer, K.H., Patronas, N.J., Schiffmann, R., Brooks, B.P., Tamura, D., and DiGiovanna, J.J. (2007). Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: A complex genotype–phenotype relationship. *Neuroscience* 145, 1388–1396.

Kraemer, S.M., Ranallo, R.T., Ogg, R.C., and Stargell, L.A. (2001). TFIIA interacts with TFIID via association with TATA-binding protein and TAF40. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1737–1746.

Krebs, A.R., Karmodiya, K., Lindahl-Allen, M., Struhl, K., and Tora, L. (2011). SAGA and ATAC histone acetyl transferase complexes regulate distinct sets of genes and ATAC defines a class of p300-independent enhancers. *Mol. Cell* 44, 410–423.

Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929–930.

Kutach, A.K., and Kadonaga, J.T. (2000). The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4754–4764.

L

Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D., and Ebright, R.H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 12, 34–44.

Lainé, J.-P., and Egly, J.-M. (2006). Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II. *EMBO J.* 25, 387–397.

Laugel, V., Dalloz, C., Durand, M., Sauvanaud, F., Kristensen, U., Vincent, M.C., Pasquier, L., Odent, S., Cormier-Daire, V., Gener, B., et al. (2010). Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. *Hum. Mutat.* 31, 113–126.

Le May, N., Mota-Fernandes, D., Vélez-Cruz, R., Iltis, I., Biard, D., and Egly, J.M. (2010a). NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol. Cell* 38, 54–66.

Le May, N., Egly, J.-M., and Coin, F. (2010b). True lies: the double life of the nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair. *J. Nucleic Acids* 2010.

Le May, N., Fradin, D., Iltis, I., Bougnères, P., and Egly, J.-M. (2012a). XPG and XPF endonucleases trigger chromatin looping and DNA demethylation for accurate expression of

activated genes. *Mol. Cell* 47, 622–632.

Le May, N., Iltis, I., Amé, J.-C., Zhovmer, A., Biard, D., Egly, J.-M., Schreiber, V., and Coin, F. (2012b). Poly (ADP-ribose) glycohydrolase regulates retinoic acid receptor-mediated gene expression. *Mol. Cell* 48, 785–798.

Lee, T.I., and Young, R.A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* 34, 77–137.

Lee, D.-H., Gershenzon, N., Gupta, M., Ioshikhes, I.P., Reinberg, D., and Lewis, B.A. (2005). Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9674–9686.

Lee, J.-H., Park, C.-J., Shin, J.-S., Ikegami, T., Akutsu, H., and Choi, B.-S. (2004). NMR structure of the DNA decamer duplex containing double T*G mismatches of cis-syn cyclobutane pyrimidine dimer: implications for DNA damage recognition by the XPC-hHR23B complex. *Nucleic Acids Res.* 32, 2474–2481.

Lee, M.S., Kliewer, S.A., Provencal, J., Wright, P.E., and Evans, R.M. (1993). Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* 260, 1117–1121.

Lee, S.-K., Yu, S.-L., Prakash, L., and Prakash, S. (2002). Requirement of yeast RAD2, a homolog of human XPG gene, for efficient RNA polymerase II transcription. implications for Cockayne syndrome. *Cell* 109, 823–834.

Legastelois, R., Jeanblanc, J., Vilpoux, C., Bourguet, E., and Naassila, M. (2017). Mécanismes épigénétiques et troubles de l’usage d’alcool : une cible thérapeutique intéressante? *Biol. Aujourd’hui* 211, 83–91.

Lehmann, A.R., Kirk-Bell, S., Arlett, C.F., Paterson, M.C., Lohman, P.H., de Weerd-Kastelein, E.A., and Bootsma, D. (1975). Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 219–223.

Lehmann, A.R., McGibbon, D., and Stefanini, M. (2011). Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J. Rare Dis.* 6, 70.

Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J.Y., Staub, A., Garnier, J.M., and Mader, S. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377–395.

Lewis, B.A., Kim, T.K., and Orkin, S.H. (2000). A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7172–7177.

Li, Y., Flanagan, P.M., Tschochner, H., and Kornberg, R.D. (1994). RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* 263, 805–807.

Licht, C.L., Stevensner, T., and Bohr, V.A. (2003). Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1217–1239.

Lifton, R.P., Goldberg, M.L., Karp, R.W., and Hogness, D.S. (1978). The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 42 Pt 2, 1047–1051.

Lindahl, T., and Wood, R.D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897–1905.

Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D., and Felsenfeld, G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* 293, 2453–2455.

Liu, X., Li, B., and Gorovsky, M.A. (1996). Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4305–4311.

Louis, B.G., and Fitt, P.S. (1971). Nucleic acid enzymology of extremely halophilic bacteria. *Halobacterium cutirubrum* deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase. *Biochem. J.* 121, 621–627.

Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J.M., and Reinberg, D. (1992). Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* 358, 641–645.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.

le Maire, A., Teyssier, C., Erb, C., Grimaldi, M., Alvarez, S., de Lera, A.R., Balaguer, P., Gronemeyer, H., Royer, C.A., Germain, P., et al. (2010). A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 801–807.

M

Maldonado, E., Shiekhatar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C.W., Linn, S., and Reinberg, D. (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* 381, 86–89.

Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841–850.

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839.

Maxon, M.E., Goodrich, J.A., and Tjian, R. (1994). Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIF: a model for promoter clearance. *Genes Dev.* 8, 515–524.

Meersseman, G., Pennings, S., and Bradbury, E.M. (1992). Mobile nucleosomes--a general behavior. *EMBO J.* 11, 2951–2959.

Mehta, M., Braberg, H., Wang, S., Lozsa, A., Shales, M., Solache, A., Krogan, N.J., and Keogh, M.-C. (2010). Individual lysine acetylations on the N terminus of *Saccharomyces cerevisiae* H2A.Z are highly but not differentially regulated. *J. Biol. Chem.* 285, 39855–39865.

Mellon, I., Bohr, V.A., Smith, C.A., and Hanawalt, P.C. (1986). Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 8878–8882.

Mellon, I., Spivak, G., and Hanawalt, P.C. (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51, 241–249.

Melters, D.P., Nye, J., Zhao, H., and Dalal, Y. (2015). Chromatin Dynamics in Vivo: A Game of Musical Chairs. *Genes* 6, 751–776.

Miesfeld, R., Okret, S., Wikström, A.C., Wrangé, O., Gustafsson, J.A., and Yamamoto, K.R. (1984). Characterization of a steroid hormone receptor gene and mRNA in wild-type and mutant cells. *Nature* 312, 779–781.

Millar, C.B., Xu, F., Zhang, K., and Grunstein, M. (2006). Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev.* 20, 711–722.

Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E.A., Darst, S.A., Ebright, R.H., and Severinov, K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 892–897.

Minucci, S., and Pelicci, P.G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 38–51.

Mocquet, V., Kropachev, K., Kolbanovskiy, M., Kolbanovskiy, A., Tapias, A., Cai, Y., Broyde, S., Geacintov, N.E., and Egly, J.-M. (2007). The human DNA repair factor XPC-HR23B distinguishes stereoisomeric benzo[a]pyrenyl-DNA lesions. *EMBO J.* 26, 2923–2932.

Mocquet, V., Lainé, J.P., Riedl, T., Yajin, Z., Lee, M.Y., and Egly, J.M. (2008). Sequential recruitment of the repair factors during NER: the role of XPG in initiating the resynthesis step. *EMBO J.* 27, 155–167.

Moreland, R.J., Tirode, F., Yan, Q., Conaway, J.W., Egly, J.M., and Conaway, R.C. (1999). A role for the TFIIH XPB DNA helicase in promoter escape by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* *274*, 22127–22130.

Moser, J., Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L.H.F., and Foustieri, M.I. (2007). Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol. Cell* *27*, 311–323.

Mosley, A.L., Pattenden, S.G., Carey, M., Venkatesh, S., Gilmore, J.M., Florens, L., Workman, J.L., and Washburn, M.P. (2009). Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation. *Mol. Cell* *34*, 168–178.

N

Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., and Chambon, P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.* *12*, 2349–2360.

Nagy, Z., Riss, A., Fujiyama, S., Krebs, A., Orpinell, M., Jansen, P., Cohen, A., Stunnenberg, H.G., Kato, S., and Tora, L. (2010). The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *67*, 611–628.

Nakada, S., Chen, G.I., Gingras, A.-C., and Durocher, D. (2008). PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep.* *9*, 1019–1026.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* *393*, 386–389.

Nance, M.A., and Berry, S.A. (1992). Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am. J. Med. Genet.* *42*, 68–84.

Narlikar, G.J., Sundaramoorthy, R., and Owen-Hughes, T. (2013). Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes. *Cell* *154*, 490–503.

Newman, J.C., Bailey, A.D., and Weiner, A.M. (2006). Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 9613–9618.

Ng, J.M.Y., Vermeulen, W., van der Horst, G.T.J., Bergink, S., Sugawara, K., Vrieling, H., and Hoeijmakers, J.H.J. (2003). A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev.* *17*, 1630–1645.

Nikolov, D.B., Chen, H., Halay, E.D., Hoffman, A., Roeder, R.G., and Burley, S.K. (1996). Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 4862–4867.

Noma K, null, Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* *293*, 1150–1155.

Nonet, M.L., and Young, R.A. (1989). Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics* *123*, 715–724.

Nonet, M., Sweetser, D., and Young, R.A. (1987). Functional redundancy and structural polymorphism in the large subunit of RNA polymerase II. *Cell* *50*, 909–915.

Nouspikel, T., Lalle, P., Leadon, S.A., Cooper, P.K., and Clarkson, S.G. (1997). A common mutational pattern in Cockayne syndrome patients from xeroderma pigmentosum group G: implications for a second XPG function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3116–3121.

O

Ohkuma, Y., Sumimoto, H., Horikoshi, M., and Roeder, R.G. (1990). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and characterization of general transcription factor TFIIE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 9163–9167.

Ohler, U., Liao, G., Niemann, H., and Rubin, G.M. (2002). Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome. *Genome Biol.* *3*, RESEARCH0087.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247–257.

Oksenyshyn, V., Bernardes de Jesus, B., Zhovmer, A., Egly, J.-M., and Coin, F. (2009). Molecular insights into the recruitment of TFIIH to sites of DNA damage. *EMBO J.* *28*, 2971–2980.

Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* *10*, 2657–2683.

Ossipow, V., Tassan, J.P., Nigg, E.A., and Schibler, U. (1995). A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell* *83*, 137–146.

Overmeer, R.M., Moser, J., Volker, M., Kool, H., Tomkinson, A.E., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F., and Fousteri, M. (2011). Replication protein A safeguards genome integrity by controlling NER incision events. *J. Cell Biol.* *192*, 401–415.

P

Pelletier, G., Stefanovsky, V.Y., Faubladiere, M., Hirschler-Laszkiewicz, I., Savard, J., Rothblum, L.I., Côté, J., and Moss, T. (2000). Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Mol. Cell* *6*, 1059–1066.

Peterson, C.L. (2002). HDAC's at work: everyone doing their part. *Mol. Cell* *9*, 921–922.

Pikaard, C.S., Haag, J.R., Ream, T., and Wierzbicki, A.T. (2008). Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci.* *13*, 390–397.

Proietti-De-Santis, L., Drané, P., and Egly, J.-M. (2006). Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *EMBO J.* *25*, 1915–1923.

Proudfoot, N.J. (1989). How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* *14*, 105–110.

Ptashne, M., and Gann, A. (1998). Imposing specificity by localization: mechanism and evolvability. *Curr. Biol.* *8*, R812–822.

Pusarla, R.-H., and Bhargava, P. (2005). Histones in functional diversification. Core histone variants. *FEBS J.* *272*, 5149–5168.

R

Rai, K., Huggins, I.J., James, S.R., Karpf, A.R., Jones, D.A., and Cairns, B.R. (2008). DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell* *135*, 1201–1212.

Ramkumar, H.L., Brooks, B.P., Cao, X., Tamura, D., DiGiovanna, J.J., Kraemer, K.H., and Chan, C.-C. (2011). Ophthalmic Manifestations and Histopathology of Xeroderma Pigmentosum: Two Clinicopathological Cases and a Review of the Literature. *Surv. Ophthalmol.* *56*, 348–361.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* *406*, 593–599.

Reardon, J.T., and Sancar, A. (2003). Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. *Genes Dev.* *17*, 2539–2551.

Reinberg, D., and Roeder, R.G. (1987). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Transcription factor IIS stimulates elongation of RNA

chains. *J. Biol. Chem.* *262*, 3331–3337.

Renaud, J.P., and Moras, D. (2000). Structural studies on nuclear receptors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *57*, 1748–1769.

Rhodes, D.R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., and Chinnaiyan, A.M. (2004). Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9309–9314.

Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J.-M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J.* *22*, 5293–5303.

Rivera-Begeman, A., McDaniel, L.D., Schultz, R.A., and Friedberg, E.C. (2007). A novel XPC pathogenic variant detected in archival material from a patient diagnosed with Xeroderma Pigmentosum: a case report and review of the genetic variants reported in XPC. *DNA Repair* *6*, 100–114.

Rochette-Egly, C., and Germain, P. (2009). Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl. Recept. Signal.* *7*, e005.

Rodríguez-Navarro, S. (2009). Insights into SAGA function during gene expression. *EMBO Rep.* *10*, 843–850.

Roeder, R.G. (1991). The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem. Sci.* *16*, 402–408.

Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 327–335.

Roeder, R.G., and Rutter, W.J. (1969). Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* *224*, 234–237.

Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., and Glass, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* *20*, 1405–1428.

Roy, R., Schaeffer, L., Humbert, S., Vermeulen, W., Weeda, G., and Egly, J.M. (1994). The DNA-dependent ATPase activity associated with the class II basic transcription factor BTF2/TFIIH. *J. Biol. Chem.* *269*, 9826–9832.

S

Samuels, M., Fire, A., and Sharp, P.A. (1982). Separation and characterization of factors mediating accurate transcription by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* *257*, 14419–14427.

Sawadogo, M., and Roeder, R.G. (1985). Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative in vitro assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 4394–4398.

Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1412–1417.

Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., Chambon, P., and Egly, J.M. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* *260*, 58–63.

Schmitz, K.-M., Schmitt, N., Hoffmann-Rohrer, U., Schäfer, A., Grummt, I., and Mayer, C. (2009). TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol. Cell* *33*, 344–353.

Schubert, S., Lehmann, J., Kalfon, L., Slor, H., Falik-Zaccai, T.C., and Emmert, S. (2014). Clinical utility gene card for: Xeroderma pigmentosum. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *22*.

Schwertman, P., Lagarou, A., Dekkers, D.H.W., Raams, A., van der Hoek, A.C., Laffeber, C., Hoeijmakers, J.H.J., Demmers, J.A.A., Fousteri, M., Vermeulen, W., et al. (2012). UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. *Nat. Genet.* *44*, 598–602.

Schwertman, P., Vermeulen, W., and Marteijn, J.A. (2013). UVSSA and USP7, a new couple

in transcription-coupled DNA repair. *Chromosoma* 122, 275–284.

Scrima, A., Konícková, R., Czyzewski, B.K., Kawasaki, Y., Jeffrey, P.D., Groisman, R., Nakatani, Y., Iwai, S., Pavletich, N.P., and Thomä, N.H. (2008). Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell* 135, 1213–1223.

Selby, C.P., and Sancar, A. (1994). Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline. *Microbiol. Rev.* 58, 317–329.

Selby, C.P., and Sancar, A. (1997). Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11205–11209.

Serizawa, H., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1993). Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature* 363, 371–374.

Setlow, R.B., and Carrier, W.L. (1966). Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *J. Mol. Biol.* 17, 237–254.

Sevilla, A., and Binda, O. (2014). Post-translational modifications of the histone variant H2AZ. *Stem Cell Res.* 12, 289–295.

Sharma, A., Singh, K., and Almasan, A. (2012). Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 920, 613–626.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941–953.

Shilatifard, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2003). The RNA polymerase II elongation complex. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 693–715.

Siegel, T.N., Hekstra, D.R., Kemp, L.E., Figueiredo, L.M., Lowell, J.E., Fenyó, D., Wang, X., Dewell, S., and Cross, G.A.M. (2009). Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev.* 23, 1063–1076.

Sims, R.J., Mandal, S.S., and Reinberg, D. (2004). Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 263–271.

Singh, A., Compe, E., Le May, N., and Egly, J.-M. (2015). TFIIH subunit alterations causing xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy specifically disturb several steps during transcription. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 194–207.

Smith, E., and Shilatifard, A. (2010). The chromatin signaling pathway: diverse mechanisms of recruitment of histone-modifying enzymes and varied biological outcomes. *Mol. Cell* 40, 689–701.

Soboleva, T.A., Nekrasov, M., Ryan, D.P., and Tremethick, D.J. (2014). Histone variants at the transcription start-site. *Trends Genet. TIG* 30, 199–209.

Sopta, M., Burton, Z.F., and Greenblatt, J. (1989). Structure and associated DNA-helicase activity of a general transcription initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Nature* 341, 410–414.

Spotswood, H.T., and Turner, B.M. (2002). An increasingly complex code. *J. Clin. Invest.* 110, 577–582.

Stefanini, M., Botta, E., Lanzafame, M., and Orioli, D. (2010). Trichothiodystrophy: from basic mechanisms to clinical implications. *DNA Repair* 9, 2–10.

Struhl, K. (1987). Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* 49, 295–297.

Sugasawa, K., Masutani, C., Uchida, A., Maekawa, T., van der Spek, P.J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., and Hanaoka, F. (1996). HHR23B, a human Rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4852–4861.

Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2001). A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 15, 507–521.

Sugasawa, K., Shimizu, Y., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2002). A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair* 1, 95–107.

Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., Tanaka, K., et al. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* *121*, 387–400.

Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 1121–1124.

T

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* *324*, 930–935.

Takedachi, A., Saijo, M., and Tanaka, K. (2010). DDB2 complex-mediated ubiquitylation around DNA damage is oppositely regulated by XPC and Ku and contributes to the recruitment of XPA. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 2708–2723.

Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P.B., Nakayama, J., Grewal, S.I., Allis, C.D., Cheng, X., and Selker, E.U. (2003). Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat. Genet.* *34*, 75–79.

Tan, Q., Linask, K.L., Ebright, R.H., and Woychik, N.A. (2000a). Activation mutants in yeast RNA polymerase II subunit RPB3 provide evidence for a structurally conserved surface required for activation in eukaryotes and bacteria. *Genes Dev.* *14*, 339–348.

Tan, W., Zolotukhin, A.S., Bear, J., Patenaude, D.J., and Felber, B.K. (2000b). The mRNA export in *Caenorhabditis elegans* is mediated by Ce-NXF-1, an ortholog of human TAP/NXF and *Saccharomyces cerevisiae* Mex67p. *RNA N. Y. N* *6*, 1762–1772.

Tantin, D., Kansal, A., and Carey, M. (1997). Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6803–6814.

Thatcher, T.H., and Gorovsky, M.A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res.* *22*, 174–179.

Thoma, F., Koller, T., and Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* *83*, 403–427.

Tokusumi, Y., Ma, Y., Song, X., Jacobson, R.H., and Takada, S. (2007). The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1844–1858.

Tremeau-Bravard, A., Riedl, T., Egly, J.-M., and Dahmus, M.E. (2004). Fate of RNA polymerase II stalled at a cisplatin lesion. *J. Biol. Chem.* *279*, 7751–7759.

Troelstra, C., van Gool, A., de Wit, J., Vermeulen, W., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1992). ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* *71*, 939–953.

Trojer, P., and Reinberg, D. (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol. Cell* *28*, 1–13.

Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., and Reuter, G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.* *13*, 3822–3831.

U

Uitley, R.T., and Côté, J. (2003). The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *274*, 203–236.

V

Valdés-Mora, F., Song, J.Z., Statham, A.L., Strbenac, D., Robinson, M.D., Nair, S.S., Patterson, K.I., Tremethick, D.J., Stirzaker, C., and Clark, S.J. (2012). Acetylation of H2A.Z is a key epigenetic modification associated with gene deregulation and epigenetic remodeling in cancer. *Genome Res.* 22, 307–321.

Vaquero, A., Loyola, A., and Reinberg, D. (2003). The constantly changing face of chromatin. *Sci. Aging Knowl. Environ.* SAGE KE 2003, RE4.

Vardabasso, C., Gaspar-Maia, A., Hasson, D., Pünzeler, S., Valle-Garcia, D., Straub, T., Keilhauer, E.C., Strub, T., Dong, J., Panda, T., et al. (2015). Histone Variant H2A.Z.2 Mediates Proliferation and Drug Sensitivity of Malignant Melanoma. *Mol. Cell* 59, 75–88.

Venema, J., Mullenders, L.H., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A., and Mayne, L.V. (1990). The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 4707–4711.

Volker, M., Moné, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol. Cell* 8, 213–224.

W

Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Peng, W., Zhang, M.Q., et al. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* 40, 897–903.

West, M.H., and Bonner, W.M. (1980). Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry (Mosc.)* 19, 3238–3245.

Wild, T., and Cramer, P. (2012). Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends Biochem. Sci.* 37, 99–105.

Williams, K., Christensen, J., and Helin, K. (2011). DNA methylation: TET proteins—guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* 13, 28–35.

Wood, R.D., Araújo, S.J., Ariza, R.R., Batty, D.P., Biggerstaff, M., Evans, E., Gaillard, P.H., Gunz, D., Köberle, B., Kuraoka, I., et al. (2000). DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 173–182.

Woychik, N.A., and Young, R.A. (1990). RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends Biochem. Sci.* 15, 347–351.

X

Xiao, B., Wilson, J.R., and Gamblin, S.J. (2003). SET domains and histone methylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 699–705.

Y

Yuan, X., Feng, W., Imhof, A., Grummt, I., and Zhou, Y. (2007). Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol. Cell* 27, 585–595.

Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225–229.

Z

Zechel, C., Shen, X.Q., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1994a). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J.* 13, 1414–1424.

Zechel, C., Shen, X.Q., Chen, J.Y., Chen, Z.P., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1994b). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats.

EMBO J. *13*, 1425–1433.

Zhou, M., and Law, J.A. (2015). RNA Pol IV and V in gene silencing: Rebel polymerases evolving away from Pol II's rules. *Curr. Opin. Plant Biol.* *27*, 154–164.

Zhou, X., Khan, S.G., Tamura, D., Ueda, T., Boyle, J., Compe, E., Egly, J.-M., DiGiovanna, J.J., and Kraemer, K.H. (2013). Abnormal XPD-induced nuclear receptor transactivation in DNA repair disorders: trichothiodystrophy and xeroderma pigmentosum. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *21*, 831–837.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* *456*, 125–129.

Zink, L.-M., and Hake, S.B. (2016). Histone variants: nuclear function and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *37*, 82–89.

Zlatanova, J., and Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *16*, 166–179.

Zotter, A., Luijsterburg, M.S., Warmerdam, D.O., Ibrahim, S., Nigg, A., van Cappellen, W.A., Hoeijmakers, J.H.J., van Driel, R., Vermeulen, W., and Houtsmuller, A.B. (2006). Recruitment of the nucleotide excision repair endonuclease XPG to sites of UV-induced dna damage depends on functional TFIIH. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 8868–8879.

Zucchi, I., Mento, E., Kuznetsov, V.A., Scotti, M., Valsecchi, V., Simionati, B., Vicinanza, E., Valle, G., Pilotti, S., Reinbold, R., et al. (2004). Gene expression profiles of epithelial cells microscopically isolated from a breast-invasive ductal carcinoma and a nodal metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 18147–18152.

Le facteur de réparation XPC est un cofacteur de l'ARN polymérase II régulant les modifications post-traductionnelles des histones lors de la transcription

Résumé

La voie de réparation NER implique une cascade de complexes protéiques dont le senseur des dommages de l'ADN (XPC/HR23B). Des mutations dans les gènes de la NER (TTD-A, XPA-G, XPV, CSA et CSB), sont associées à des maladies génétiques humaines dont le *Xeroderma Pigmentosum* (XP), la Trichothiodystrophie (TTD) et le syndrome de Cockayne (CS). L'ensemble des symptômes des patients ne peut être expliqué seulement par un défaut de la réparation de l'ADN. Or depuis quelques années, il a été prouvé que les facteurs de la NER sont aussi impliqués lors de la transcription. Dans le cadre de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à la protéine XPC en déterminant son rôle transcriptionnel à l'échelle génomique afin de mieux comprendre les conséquences de sa dérégulation dans un contexte pathologique. En ce sens, mon second objectif a été de caractériser au niveau moléculaire l'étiologie de nouveaux patients XP en analysant de manière combinée les événements moléculaires de la NER et la transcription associés à XPC. Nos différentes approches expérimentales ont permis d'identifier au niveau génomique un ensemble de gènes dont les promoteurs sont régulés aussi bien positivement que négativement par XPC dans un contexte RAR dépendant. De plus, nous montrons que XPC interagit avec KAT2A contenu dans le complexe ATAC, ainsi que qu'avec le facteur de transcription E2F1, le facteur de remodelage de la chromatine BRD2 et le variant d'histone H2A.Z. Via KAT2A, ce complexe va acétyler non seulement H2A.Z mais également H3K9 au niveau des promoteurs ciblés par E2F1.

Mots clés : XPC, NER, Transcription, Réparation, KAT2A, E2F1, BRD2, PTMs

Résumé en anglais

NER involves a cascade of protein complexes including the DNA damage sensor (XPC/HR23B). Mutations in NER genes (TTD-A, XPA-G, XPV, CSA and CSB) are associated with human genetic diseases including *Xeroderma pigmentosum* (XP), Trichothiodystrophy (TTD) and Cockayne Syndrome (CS). All the symptoms can only be explained by a defect of the DNA repair. However, it has been proven that NER factors are also involved in transcription. As the genomic scale to better understand the consequences of its deregulation in a pathological context. In this sense, my second goal has been to characterize at the molecular level the etiology of new XP patients by analyzing in a combined way the molecular events of the NER and the transcription associated with XPC. Our different experimental approaches have made it possible to identify at genomic level a set of gene whose promoters are regulated both positively and negatively by XPC in a dependent RAR context. In addition, we show that XPC interacts with KAT2A contained in the ATAC complex, as well as with the transcription factor E2F1, the chromatin remodeling factor BRD2, and the histone variant H2A.Z. Via KAT2A, this complex will acetylate not only H2A.Z but also H3K9 at promoters targeted by E2F1.

Keywords : XPC, NER, Transcription, DNA repair, KAT2A, E2F1, BRD2, PTMs