



HAL
open science

Rôle de l'organisation 3D de la chromatine dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN

Coline Arnould

► **To cite this version:**

Coline Arnould. Rôle de l'organisation 3D de la chromatine dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30141 . tel-03213268

HAL Id: tel-03213268

<https://theses.hal.science/tel-03213268v1>

Submitted on 30 Apr 2021

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Coline ARNOULD

Le 17 décembre 2020

Rôle de l'organisation 3D de la chromatine dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Unité de recherche :

LBCMCP - Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération

Thèse dirigée par

GAELE LEGUBE et Thomas CLOUAIRE

Jury

Mme Armelle Lengronne, Rapporteur

M. Thomas Sexton, Rapporteur

Mme Sophie Polo, Examinatrice

Mme Kerstin Bystricky, Examinatrice

M. Daniel Noordermeer, Examineur

Mme Gaëlle Legube, Directrice de thèse

M. Thomas Clouaire, Co-directeur de thèse

Tout d'abord je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, Armelle Lengronne, Thomas Sexton et Sophie Polo pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement Kerstin Bystricky et notre collaborateur Daan Noordermeer pour avoir également participé à mes comités de thèse. Merci pour votre aide et vos bons conseils.

Je souhaiterais remercier l'ensemble du CBI, qui offre un environnement idéal pour travailler, communiquer et s'épanouir scientifiquement. Je remercie évidemment tout particulièrement l'équipe Legube. Un immense merci à Gaëlle pour m'avoir fait confiance et permis de faire une thèse très épanouissante, enrichissante et dans une équipe super. C'est une chance d'avoir une chef aussi géniale humainement que scientifiquement. Je ne te remercie pas par contre pour les shots de Jägermeister... Merci à Anne-Laure pour ta bonne-humeur, ton écoute et ta douce folie, ton moonwalk et ta vague des bras entre deux paillasses va me manquer. Merci à Emma, la mère de mes poissons, je te souhaite une bonne fin de thèse et je te confie la garde des enfants. Merci à Vincent pour avoir analysé toutes mes données de seq et pour avoir commencé ma formation de bio-informatique avec patience et pédagogie. Enfin merci à Thomas pour tous tes conseils, Sarah Cohen pour les chants et les danses du genou sur du Francis ou du Goldman, Aline, Nadine, Béa, Aude, Raph, Sarah Collins, Manu, Benjamin, Florian et Nathalie pour votre aide, pour les discussions scientifiques ou non et parce c'était super agréable de pouvoir travailler dans cette équipe avec vous tous. #Team RTL2 !

Merci à toute ma famille, qui me soutient énormément, même si vous enjolivez toujours très légèrement ma réussite. Je remercie tout particulièrement mes parents pour leur amour sans condition et leur soutien. Je remercie également ma grand-mère et Momo, qui attendent désespérément le prix Nobel (désolée mamie faudra être (très) patiente). Merci à ma petite sœur adorée Prime, à mon frère adoré len len, à ma belle-sœur Marianne, qui m'apporte sa sagesse sur le cerveau et les hormones, à Elliot et Guetty, qui sont tout comme ma famille et à mes neveux Maëlle et Sam.

Je souhaite également remercier mes amies du Lycée (C2AV) Anne-Marie, Claire et Virginie, et mon amie de toujours Manon. Après toutes ces années, vous êtes toujours là et j'espère que ça durera encore longtemps. Merci à la bande de boloss de l'UPSI : Jade, Julien et Fages et à mes potes de plongée Juju et Jean. Je vous attends tous en visite à San Francisco !

Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement Jérémie. Tu m'as supportée quand j'étais stressée et (très) légèrement pénible pendant toute ma thèse et tu as égayé chaque journée de cette thèse ! J'ai beaucoup de chance de t'avoir dans ma vie et j'ai hâte de partir en post-doc avec toi au soleil de Californie.

RÉSUMÉS

L'intégrité du génome est quotidiennement menacée par de nombreux dommages. Parmi ces dommages, les cassures double-brin de l'ADN (DSB pour Double-Strand Breaks) sont considérées comme les plus dangereuses puisque si elles sont mal réparées, elles peuvent conduire à la formation de réarrangements chromosomiques, à l'origine de nombreux cancers. Suite à l'apparition de DSB dans le génome, la kinase ATM établit rapidement un domaine de chromatine de l'ordre du mégabase couvert par γ H2AX afin de former un foyer de réparation. Comment ces foyers de réparation sont formés sur une si grande surface autour des DSB afin de promouvoir la signalisation de ces dommages n'est pas encore bien compris. De façon importante, le génome est organisé en trois dimensions dans le noyau. Les TAD (Topologically Associating Domains) correspondent à une unité clé de cette organisation de la chromatine et ont été impliqués dans des processus tels que la transcription ou la réplication. Pourtant le rôle des TAD et de leurs mécanismes de formation par les cohésines dans la réparation n'est pas encore connu. Certaines observations suggèrent un lien entre les TAD et la réparation puisqu'il a été rapporté que les cohésines sont recrutées aux DSB et que les frontières des TAD corrélaient avec les frontières des foyers de réparation (Caron et al., 2012; Kim et al., 2002b; Unal et al., 2004). D'autre part, des études préalables ont montré que les DSB sont capables de se regrouper dans le noyau au sein de foyers de réparation communs (Aten, 2004; Aymard et al., 2017; Caron et al., 2015; Schrank et al., 2018). Cependant la fonction et les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ce processus de regroupement des DSB restent en grande partie inconnus.

Durant ma thèse, je me suis intéressée au rôle des TAD et des cohésines dans l'établissement des foyers de réparation couverts par γ H2AX, ainsi que dans le regroupement des DSB et la formation de réarrangements chromosomiques. Pour cela j'ai réalisé des études à haute-résolution et à grande échelle à l'aide de techniques telles que le Hi-C, le 4C-seq et la ChIP-seq dans le système cellulaire humain DivA, qui permet d'induire de multiples DSB annotées sur le génome.

Nos travaux ont permis de montrer que les TAD sont une unité fonctionnelle de la réparation à différentes échelles puisque i) ils délimitent la propagation de γ H2AX donc sont le support de la formation des foyers de réparation, ii) ils sont renforcés en réponse aux DSB et iii) ils sont l'unité de base du regroupement des DSB. En effet, nous avons mis en évidence un processus de « loop extrusion » unidirectionnel et dépendant des cohésines, mis en place de part et d'autre de chaque DSB afin qu'ATM phosphoryle H2AX sur un TAD entier de façon très rapide. Nous avons montré qu'ATM possède également un rôle dans ce processus de « loop extrusion », qui pourrait dépendre de son rôle dans le recrutement des cohésines aux DSB. D'autre part, nous avons montré que l'ensemble des TAD du génome est renforcé en réponse aux DSB de façon dépendante d'une accumulation des cohésines sur les frontières de boucles de chromatine et de TAD. Enfin, nous avons démontré que le regroupement des DSB, qui a lieu principalement durant la phase G1 du cycle cellulaire, est réalisé à l'échelle des TAD endommagés entiers, phénomène pouvant donner lieu à la formation de TAD cliques, où jusqu'à six TAD endommagés interagissent ensemble, d'une façon qui coïncide avec la quantité de γ H2AX sur ces TAD. De façon importante, cet événement de TAD cliques peut mener à la formation de réarrangements chromosomiques, qui peuvent être très néfastes pour les cellules.

The genome integrity is threatened daily by numerous damages. Among these damages, DNA double-strand breaks (DSB) are considered the most dangerous because if they are badly repaired, they can lead to the formation of chromosomal rearrangements, which are at the origin of many cancers. Upon DSBs, the PI3K kinase ATM rapidly triggers the establishment of megabase-sized, γ H2AX-decorated chromatin domains which further act as seeds for the formation of repair foci. How these foci are rapidly assembled in order to ensure the DSB signaling is yet unclear. Importantly, the genome is organized in three dimensions in the nucleus. Topologically Associating Domains (TADs) are a key feature of 3D genome organization that compartmentalize transcription and replication, but little is known about their contribution to DNA repair. Some observations suggest a link between TADs and repair since cohesins, which contribute to TAD formation, are recruited to DSBs and TAD boundaries correlate with repair foci boundaries (Caron et al., 2012; Kim et al., 2002; Unal et al., 2004). On the other hand, previous studies have shown that DSBs are able to cluster within common repair foci (Aten, 2004; Aymard et al., 2017; Caron et al., 2015; Schrank et al., 2018). However, the function and molecular mechanisms involved in this process of DSB clustering remain largely unknown.

The aim of my PhD was to study the role of TADs and cohesins in the establishment of γ H2AX-covered repair foci, as well as in DSBs clustering and chromosomal rearrangements. To this end, I have performed high-resolution and high-throughput studies using techniques such as Hi-C, 4C-seq and CHIP-seq in the human DivA cell line, which allows the induction of multiple annotated DSBs on the genome.

Our work showed that TADs are functional units of repair at different scales since i) they delineate the propagation of γ H2AX and thus are the theater of repair foci formation, ii) they are strengthened in response to DSBs and iii) they are the basic unit of DSB clustering. Indeed, we showed a unidirectional and cohesin-dependent "loop extrusion" process which takes place on either side of each DSB to allow H2AX phosphorylation by ATM on an entire TAD in a very fast manner. ATM also has a role in this "loop extrusion" process, which may depend on its role in the recruitment of cohesins at DSBs sites. On the other hand, we showed that the TADs of the whole genome are strengthened in response to DSBs, due to an accumulation of cohesins on chromatin loops and TAD borders. Finally, we showed that DSBs clustering, which takes place mainly during the G1 phase of the cell cycle, is performed at the scale of the whole damaged TADs, a phenomenon that can lead to the formation of TAD cliques, where up to six damaged TADs interact together, in a way that coincides with the amount of γ H2AX on these TADs. Importantly, TAD cliques can lead to the formation of chromosomal rearrangements, which can be very harmful to the cells.

SOMMAIRE

RÉSUMÉS	1
SOMMAIRE	4
INTRODUCTION	8
I. L'organisation de l'ADN dans le noyau	9
1. La chromatine	9
A. Composition de la chromatine	9
B. Niveaux supérieurs de compaction de l'ADN.....	10
C. La régulation de la chromatine	11
C1. Les modifications post-traductionnelles des histones	11
C2. Les variants d'histones	11
2. Organisation tridimensionnelle de la chromatine.....	12
A. Les technologies d'étude de l'organisation 3D de la chromatine.....	12
A1. Le DNA-FISH	12
A2. Les techniques de capture de conformation de la chromatine	13
B. Les TAD (Topologically associating domains)	14
B1. La formation des TAD, un mécanisme CTCF-dépendant.....	16
B2. La formation des TAD, un mécanisme dépendant des cohésines.....	17
B3. Le modèle de la « loop extrusion »	18
B4. Le rôle des TAD dans les processus biologiques.....	20
C. Les compartiments A et B.....	23
C1. Lien entre les compartiments et les TAD et avec la séparation de phase	24
3. Niveaux supérieurs d'organisation de la chromatine dans le noyau	25
A. Les territoires chromosomiques.....	25
B. Les domaines associés aux lamines	26
C. Le nucléole.....	26
II. La réparation des cassures double-brin de l'ADN	28
1. Détection et signalisation des DSB	28
A. Arrêt du cycle cellulaire	29
B. Les foyers de réparation.....	30
B1. γ H2AX	30
B2. MDC1	32
B3. 53BP1	33
2. Les mécanismes de réparation des DSB	33
A. La Jonction d'Extrémités Non Homologues	34
B. La recombinaison Homologue.....	35
C. Choix de la voie de réparation.....	36
C1. Le cycle cellulaire : pour ou contre la résection	36
C2. Le contexte chromatinien	37
3. Réparation des DSB couplée à la transcription	38
A. Mécanismes de réparation spécifiques.....	38
B. Inhibition de la transcription.....	38

B1. Inhibition de la transcription aux DSB	39
B2. Inhibition de la transcription en cis des DSB	40
III. Rôle de l'organisation 3D de la chromatine dans la réparation des DSB	42
1. Modifications de la chromatine en réponse aux DSB	42
A. Modification du paysage chromatinien après dommages	42
B. Compaction et décompaction de la chromatine après dommages	43
B1. Une phase initiale de décompaction de la chromatine en réponse aux dommages	43
B2. La recompaction de la chromatine après la phase initiale de décompaction	43
2. Rôle de l'organisation 3D de la chromatine dans la réparation des DSB	44
A. Rôle des TAD dans la réparation	45
A1. Rôle des TAD préexistants dans la réparation	45
A2. Remodelage des TAD en réponse aux DSB	46
B. Recrutement et rôle des cohésines dans la réparation des DSB	46
B1. Accumulation des cohésines aux DSB	46
B2. Rôle des cohésines dans la réparation des DSB	47
C. Recrutement et rôle de CTCF dans la réparation des DSB	48
3. La mobilité des DSB dans le noyau	49
A. Les observations en faveur de la mobilité des DSB	50
A1. Le cas de l'exclusion hors de l'hétérochromatine	50
A2. Le cas de l'exclusion hors du nucléole	51
A3. Le cas de la relocalisation vers la périphérie nucléaire	52
B. Le regroupement des DSB	53
B1. Les preuves du regroupement des DSB	53
B2. Les effets potentiels du regroupement des DSB sur la réparation	55
C. Une mobilité active ?	57
C1. Réseau d'actine	57
C2. La tubuline	58
C3. Le complexe LINC	59
D. Une mobilité passive ?	60
RÉSULTATS	62
I. La formation des foyers de réparation autour des cassures double-brin de l'ADN dépend du mécanisme de « loop extrusion »	64
II. Réorganisation de la chromatine en 3D à différentes échelles en réponse aux cassures double-brin de l'ADN	102
1. Introduction	102
2. Résultats	103
A. Renforcement cohésine-dépendant des TAD à l'échelle du génome entier	103
B. Le renforcement des TAD après dommage est plus prononcé dans les TAD endommagés	104

C. Le regroupement des DSB est réalisé à l'échelle du TAD, permettant la formation de « TAD cliques »	105
D. Le regroupement des DSB à lieu en G1 et peut conduire à la formation de translocations	106
E. La conformation initiale de la chromatine prédit quels gènes seront réprimés après l'apparition de DSB en cis	108
3. Conclusion	108
DISCUSSION	110
I. Le rôle de la loop extrusion dans la réparation des DSB	111
A. Le rôle de la loop extrusion dans l'établissement des foyers de réparation	111
A1. Etablissement rapide des foyers de réparation grâce aux cohésines	111
A2. Recrutement des cohésines aux DSB	112
B. Rôle de la loop extrusion dans la réparation des DSB	113
B1. Rôle de la loop extrusion dans les mécanismes de réparation des DSB	113
B2. Rôle de la loop extrusion dans la répression des gènes en cis	114
B3. Rôle de la loop extrusion dans la CSR et dans la V(D)J	115
C. Le rôle de la loop extrusion dans le dépôt d'une marque d'histone	116
II. Effet de la présence de cassures double-brin sur la structure tridimensionnelle du génome	116
A. Renforcement des TAD en réponse aux DSB	116
B. Les causes du renforcement des TAD	117
B1. Renforcement des TAD endommagés	118
B2. Renforcement des TAD non endommagés	120
C. Les rôles possibles du renforcement des TAD	120
III. Le regroupement des cassures double-brin de l'ADN	121
A. Le regroupement des DSB à l'échelle des TAD : formation de TAD cliques	122
B. Le regroupement des DSB dépend-il de la séparation de phase ou d'une mobilité active ?	122
C. Le regroupement des DSB peut conduire à la formation de translocations	123
D. Les potentiels bénéfiques du regroupement des DSB	124
D1. Concentrer les facteurs de réparation ?	125
D2. Mettre en pause la réparation ?	125
D3. Utiliser une voie de réparation alternative ?	126
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	127
ANNEXES	149
Arnould and Legube, 2019 (revue JMB)	
Arnould et al., 2021 (méthode MIMB)	
Aymard et al, 2017 (article NSMB)	
Clouaire et al, 2018 (article Mol Cell)	
Marnef et al, 2019 (article Genes and Dev)	

INTRODUCTION

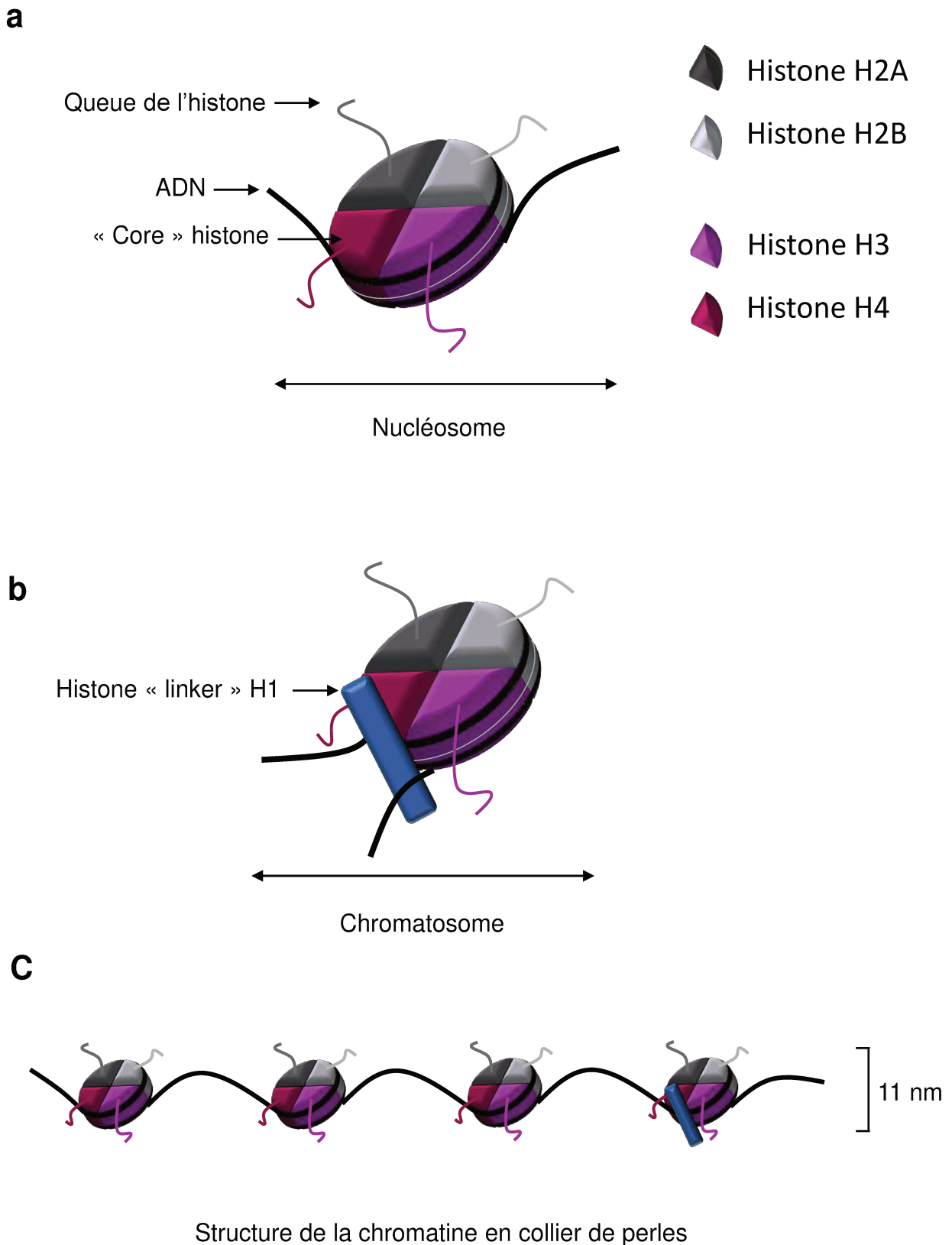


Figure 1 : Structure de base de la chromatine.

(a) L'enroulement de 147 paires de base d'ADN autour d'un octamère d'histones forme l'unité de base de la chromatine: le nucléosome. Chaque histone est composée d'une partie « core » histone et d'une queue, qui est exposée hors du nucléosome. (b) L'ajout potentiel de l'histone « linker » H1 au nucléosome forme une structure plus stable: le chromatosome. (c) L'enchaînement de nucléosomes et/ou de chromatosomes forme une structure de 11 nm de diamètre appelée structure en collier de perles.

I. L'organisation de l'ADN dans le noyau

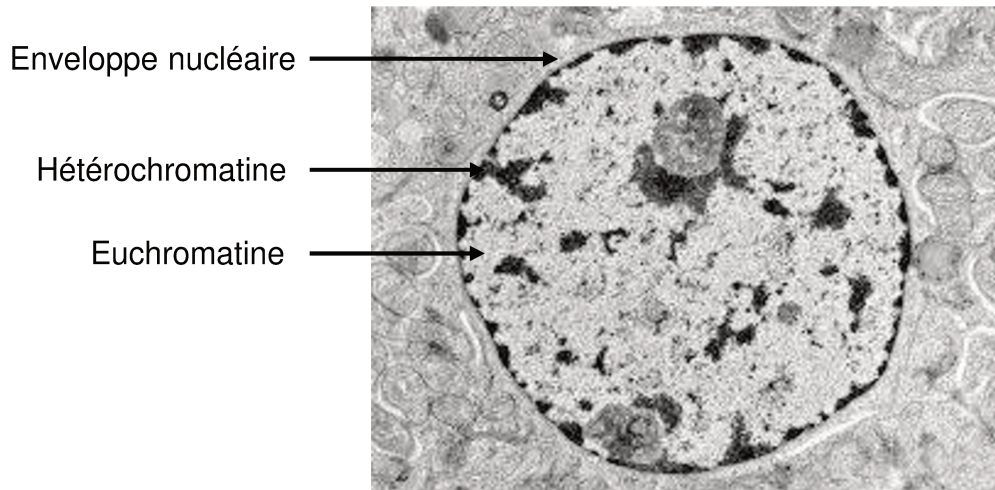
L'ADN (Acide Désoxyribonucléique) est essentiel à la vie car il est le support de l'information génétique qui nous constitue. Chez l'homme, l'ADN d'une cellule est constitué de 3 milliards de paires de bases (pb) réparties sur 23 paires de chromosomes. Si les molécules d'ADN des différents chromosomes étaient mises bout à bout, la molécule d'ADN aurait une longueur de deux mètres. Afin d'être logé dans le noyau de la cellule, qui mesure seulement $\sim 10\mu\text{M}$, l'ADN nécessite un repliement considérable. Pour cela, l'ADN n'est pas nu dans le noyau mais s'associe avec des protéines, qui lui permettent de s'organiser et de se compacter. L'association de l'ADN et de protéines forme un complexe nucléoprotéique appelé la chromatine.

1. La chromatine

A. Composition de la chromatine

La chromatine est constituée d'un enchainement de nucléosomes, qui sont l'unité fondamentale de la chromatine. Chaque nucléosome est constitué de ~ 146 pb d'ADN qui s'enroule en 1,7 tours autour d'un octamère de petites protéines, appelées histones (Luger, 1997). Il existe quatre histones dites canoniques : H2A, H2B, H3 et H4. Pour former un octamère, H2A et H2B s'assemblent pour former deux hétéro-dimères, qui vont s'associer par la suite avec un tétramère d'histones H3/H4 (Figure 1a). Les histones sont des protéines très conservées chez les eucaryotes. Chaque histone est formée de deux parties : une partie globulaire appelée le « core » ou cœur et les extrémités de l'histone appelées « queues » des histones. La partie « core » exerce un rôle dans la liaison de l'histone à l'ADN ainsi que dans la liaison des histones entre elles, tandis que la queue de l'histone se retrouve exposée à l'extérieur de l'octamère d'histones où elle est ainsi accessible et peut subir des modifications post-traductionnelles. L'histone H1, ou linker, peut s'associer avec le nucléosome pour former ce que l'on appelle le chromatosome, contribuant ainsi à la stabilisation du nucléosome (Fyodorov et al., 2018) (Figure 1b). La fibre de chromatine ainsi constituée de nucléosomes et/ou de chromatosomes, qui est également appelée fibre de 11 nm en raison de son diamètre ou « collier de perle » en raison de son apparence, représente le premier niveau de compaction de l'ADN (Figure 1c).

a



b

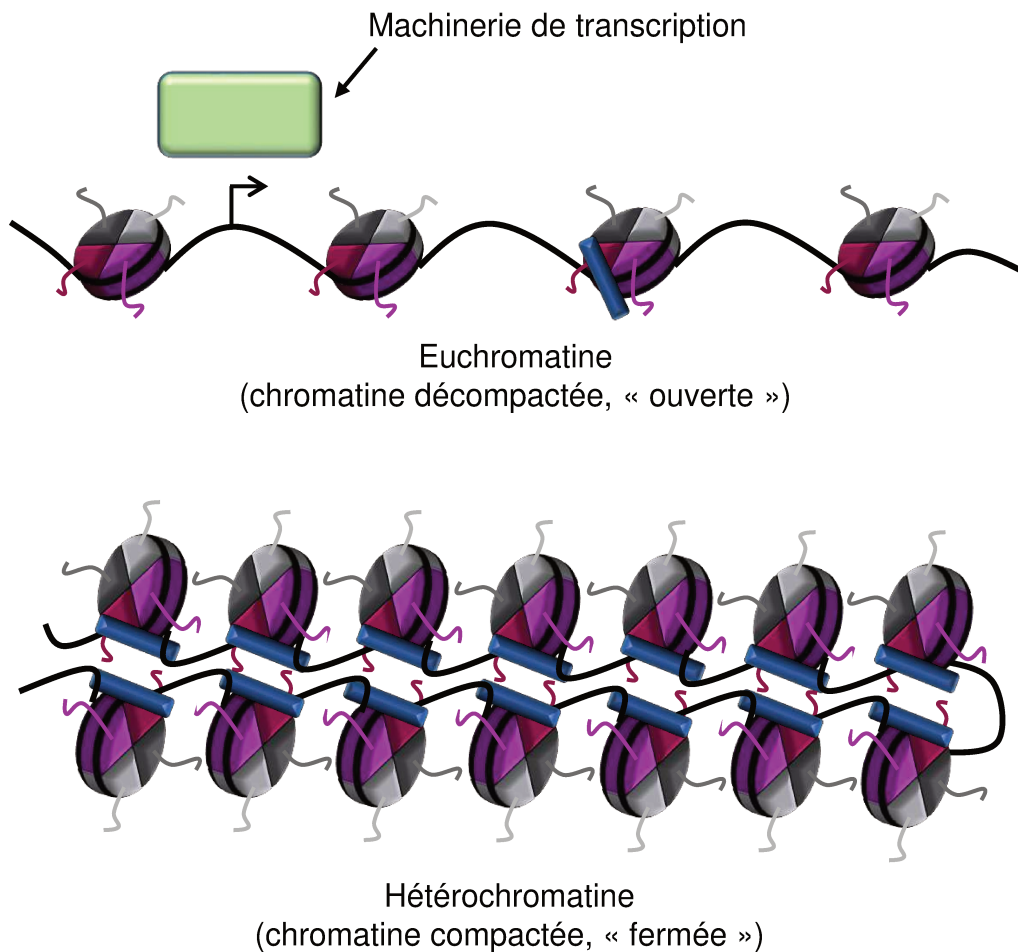


Figure 2 : L'euchromatine et l'hétérochromatine.

(a) Noyau d'une cellule de mammifère visualisé en microscopie électronique à transmission (d'après le site <http://medcell.med.yale.edu/>). L'hétérochromatine apparaît sombre, dense aux électrons. Au contraire, l'euchromatine apparaît claire, peu dense aux électrons. (b) Schéma représentant l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine est moins compactée que l'hétérochromatine, ce qui lui permet d'être plus accessible à la machinerie de transcription. Elle est donc plus favorable à la transcription des gènes. L'hétérochromatine est plus fermée et constitue un environnement non favorable à la transcription.

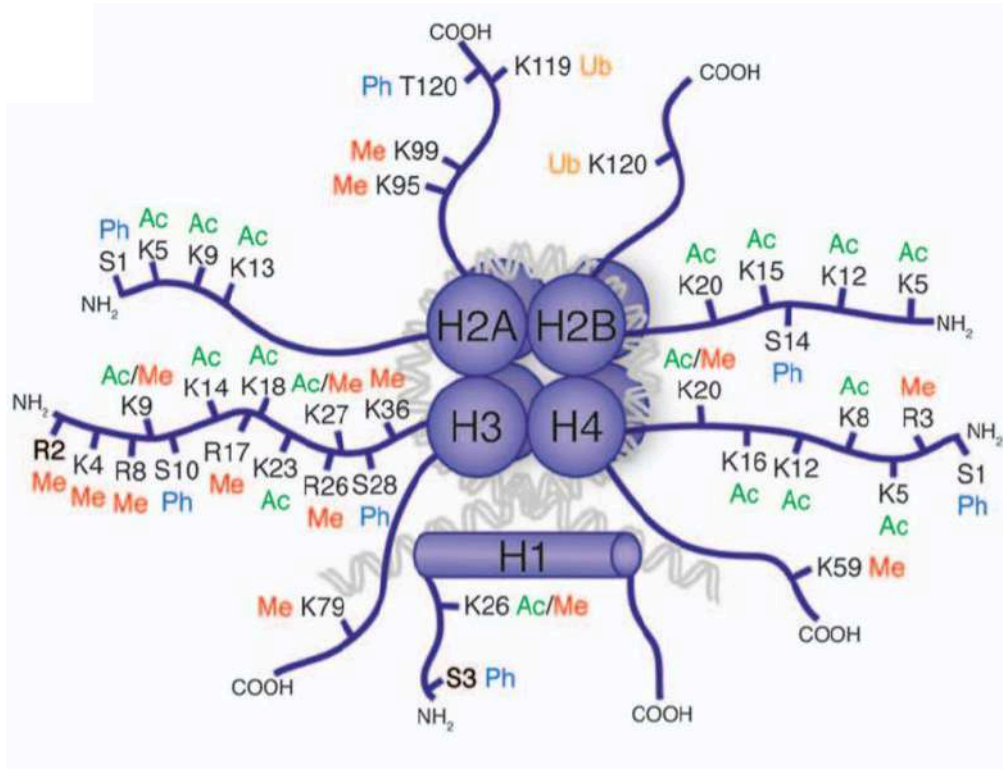
B. Niveaux supérieurs de compaction de l'ADN

Il a été montré que l'ADN pouvait être compacté en fibres allant de 5 nm à 24 nm de diamètre, ceci soulevant la possibilité de l'existence d'un niveau de compaction supérieur de la chromatine (Ou et al., 2017). En effet, il a été proposé que les différents nucléosomes pourraient interagir entre eux, potentiellement en faisant intervenir l'histone H1, pour former des arrangements supra-nucléosomaux, de diamètres variables selon le degré d'interaction des nucléosomes entre eux. Bien que le degré de compaction des arrangements supra-nucléosomaux, ainsi que le diamètre des fibres chromatiniennes qu'ils peuvent générer *in vivo* nécessitent davantage d'investigations, il apparaît clair, depuis de nombreuses années déjà, que la compaction de l'ADN n'est pas régulière sur toute la molécule d'ADN.

En effet, en interphase, des observations cytologiques de l'ADN dans le noyau ont permis de révéler deux états principaux de compaction de la chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine (Bierne et al., 2009; Heitz, 1928). Chez les mammifères, l'euchromatine apparaît peu dense aux électrons en microscopie électronique à transmission (MET) et semble localisée plutôt vers le centre du noyau (Figure 2a). Elle est constituée d'un ensemble de régions d'ADN où l'état de compaction de celui-ci est relativement faible et qui correspond à ce que l'on appelle une chromatine « ouverte ». Grâce à son état chromatinién ouvert, l'ADN y est moins protégé par les structures nucléosomales et est ainsi plus accessible pour des protéines impliquées dans des processus biologiques ayant lieu au niveau de la molécule d'ADN tels que la transcription. Cette chromatine ouverte est donc favorable à la transcription de l'ADN et constituée principalement de gènes actifs. Cependant, elle peut aussi contenir des gènes inactifs et des régions inter-géniques, qui contiennent par exemple des enhancers. L'hétérochromatine, quant à elle, apparaît plus dense aux électrons en MET et est principalement située en périphérie du noyau (Figure 2a). Elle correspond à une chromatine plus compactée, donc plus « fermée ». Cela implique que la transcription y est beaucoup moins permise que dans l'euchromatine. L'hétérochromatine est composée des régions télomériques, centromériques, des régions répétées et de gènes inactifs.

Les états de compaction très différents entre ces deux types de chromatine peuvent s'expliquer par leur densité en nucléosomes et en chromatosomes, par leur capacité à interagir entre eux (Figure 2b), par l'association de l'ADN avec des protéines non histones, ou bien par des modifications post-traductionnelles des histones.

a



b

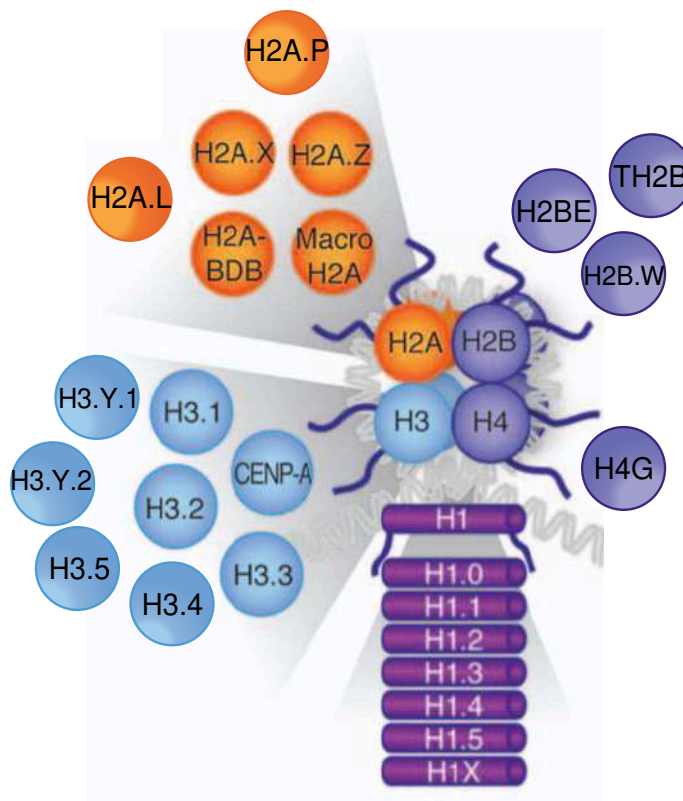


Figure 3 : Régulation de la chromatine.

(a) Les différentes modifications post-traductionnelles des histones (d'après Tollorvey and Lunyak, 2012) (b) Les différents types de variants d'histones (adapté de Tollorvey and Lunyak, 2012).

C. La régulation de la chromatine

La chromatine est une structure très dynamique, dont la compaction peut être modulée afin de rendre l'ADN plus ou moins accessible, par exemple pour permettre la transcription d'un gène. Le niveau de compaction de la chromatine peut être finement régulé par divers procédés. Parmi ceux-ci, il existe par exemple l'incorporation de variants d'histones dans les nucléosomes ou les modifications post-traductionnelles des histones.

C1. Les modifications post-traductionnelles des histones

Afin de réguler la dynamique et la compaction de la chromatine, les histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles, appelées également marques d'histones. La majorité de ces modifications sont réalisées sur la queue N-terminale des histones, qui est exposée hors des nucléosomes et qui est donc facilement accessible. Il existe plusieurs modifications post-traductionnelles des histones, dont les effets sur les propriétés de la chromatine sont différents, par exemple l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation (Figure 3a) (Bannister and Kouzarides, 2011). Ces modifications peuvent soit, grâce à leurs propriétés physico-chimiques, conduire à une modification de la compaction de la chromatine, soit agir comme plateforme de recrutement pour d'autres protéines, qui vont, elles-mêmes, agir sur l'organisation de la chromatine. Par exemple, une acétylation de l'histone H4 provoque une diminution de l'interaction de l'histone avec l'ADN, induisant une moins bonne stabilité du nucléosome et donc une chromatine moins compacte, plus ouverte et favorable à la transcription (Hong et al., 1993). Au contraire, d'autres marques d'histones peuvent agir comme plateforme de recrutement et permettre de recruter d'autres protéines appelées « readers ». Ces « readers » peuvent ainsi jouer un rôle dans la compaction de l'ADN ou dans le recrutement d'autres protéines dans le but de réguler des processus tels que la transcription ou la réparation (Musselman et al., 2012). Les modifications post-traductionnelles des histones sont réversibles et dynamiques et sont impliquées dans tous les processus liés à l'ADN.

C2. Les variants d'histones

Les variants d'histones sont codés par des gènes différents des histones canoniques mais ont des séquences similaires à elles et peuvent se substituer à ces dernières dans les nucléosomes. Contrairement aux histones canoniques qui ne sont produites qu'en phase S du cycle cellulaire, les variants d'histones peuvent s'incorporer dans la chromatine tout au long

INTRODUCTION

du cycle cellulaire. En étant incorporés dans les nucléosomes à la place des histones canoniques, ils peuvent conférer des propriétés très différentes à la chromatine, notamment en jouant sur sa compaction et/ou sa dynamique, et ce de façon directe ou indirecte (en recrutant des protéines spécifiques de chaque variant). Chez l'homme, il existe des variants de chaque histone canonique (Figure 3b) (Martire and Banaszynski, 2020). Par exemple, H2AX est un variant de l'histone H2A, qui possède un rôle majeur dans la réparation de l'ADN. Selon les types cellulaires, H2AX représente de 2 à 25% de la quantité des histones H2A d'une cellule (Fernandez-Capetillo et al., 2004). Il est distribué de façon ubiquitaire sur la chromatine, avec un léger enrichissement près des gènes actifs et une déplétion près des centromères (Iacovoni et al., 2010). H2AX a la particularité de posséder une queue dans sa partie C-terminale, qui, tout comme la queue en N-terminale, peut subir des modifications post-traductionnelles. H2AX possède d'ailleurs dans cette région un motif très conservé, qui peut être phosphorylé et qui est impliqué dans la réparation de l'ADN. Cette phosphorylation de H2AX nous intéressera plus particulièrement dans les chapitres suivants.

2. Organisation tridimensionnelle de la chromatine

La fibre de chromatine, qui peut être plus ou moins compactée selon les régions du génome, peut adopter des niveaux d'organisation supérieurs. En effet, elle peut se replier sur elle-même dans l'espace du noyau pour adopter différentes conformations tridimensionnelles. Cette organisation supérieure en 3D n'est pas aléatoire mais est au contraire précisément établie.

A. Les technologies d'étude de l'organisation 3D de la chromatine

A1. Le DNA-FISH

Depuis de nombreuses années, l'organisation de l'ADN dans le noyau est étudiée grâce à des techniques de DNA-FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Cette étude est basée sur l'hybridation de sondes fluorescentes ciblant des locus spécifiques de l'ADN puis de leur visualisation en microscopie à fluorescence. Elle a pour avantage de visualiser directement la proximité spatiale entre deux locus d'intérêt (ou plus) à l'échelle de la cellule unique. Les techniques de DNA-FISH ont notamment permis d'étudier l'organisation des chromosomes dans le noyau avec le « chromosome painting » (voir partie 3A). Bien que les techniques de DNA-FISH aient évolué vers une résolution beaucoup plus importante des locus étudiés, avec

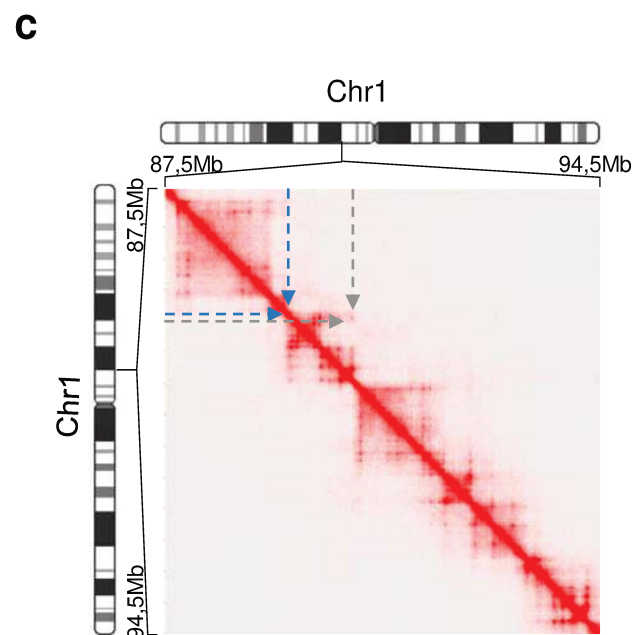
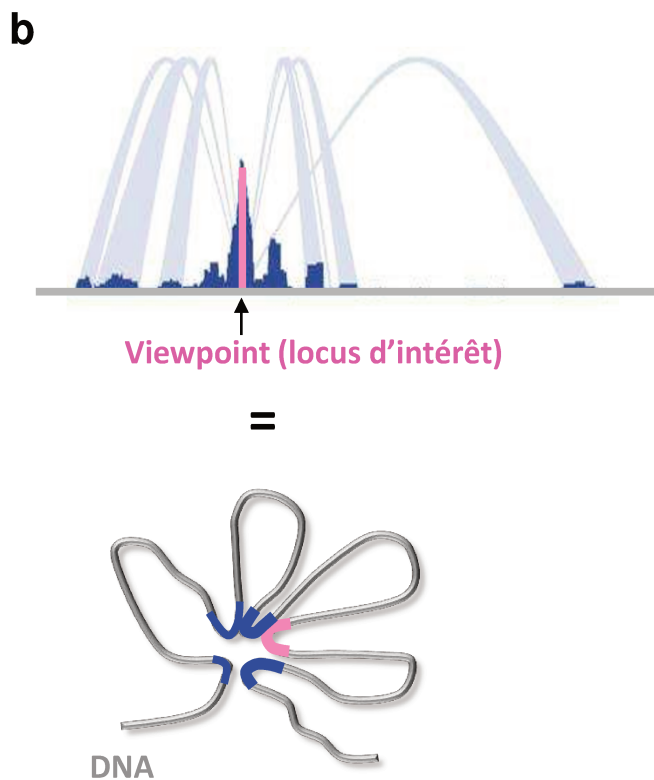
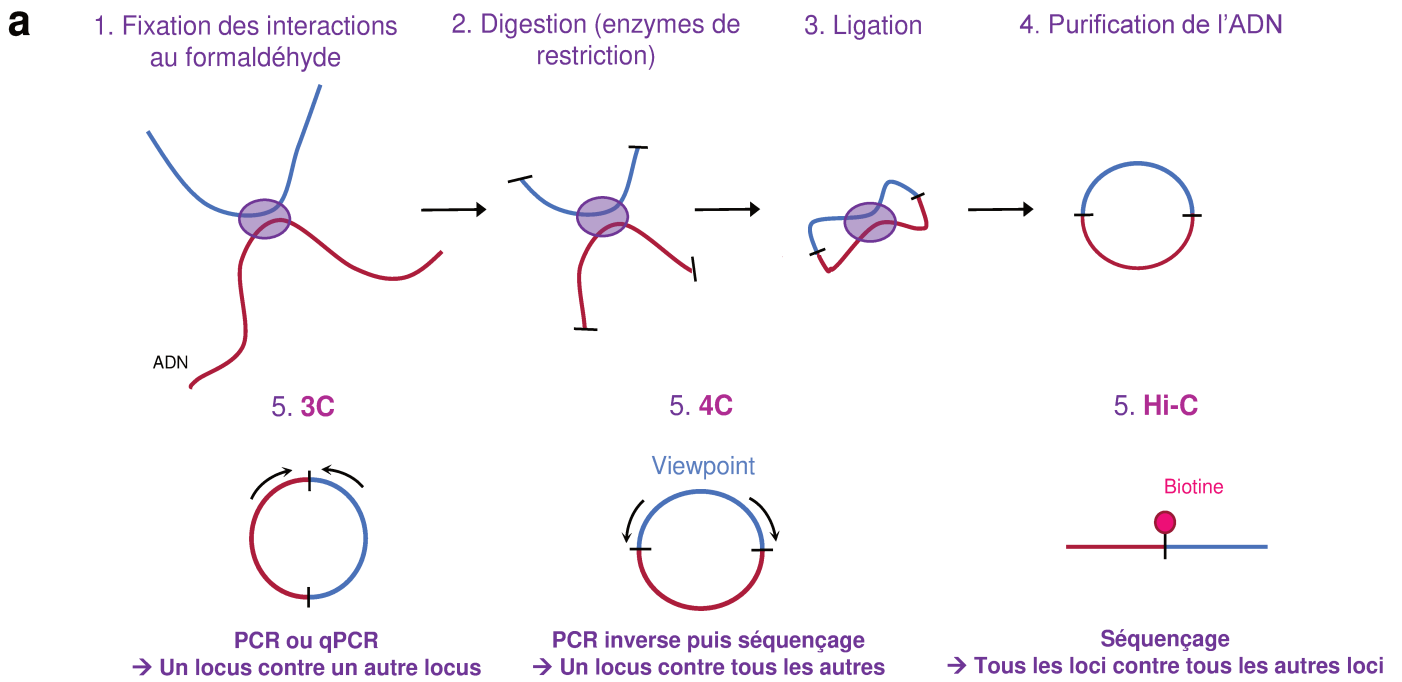


Figure 4 : Techniques d'étude de l'organisation de la chromatine en 3D.

(a) Techniques de capture de conformation de la chromatine. Après une étape de fixation des interactions entre fragments de chromatine spatialement proches, la chromatine est digérée par une enzyme de restriction. La chromatine est ensuite religuée puis purifiée pour former un ADN circulaire chimère contenant les régions d'ADN qui interagissaient ensemble. Pour le 3C, l'analyse des produits de ligation s'effectue par PCR ou qPCR. Pour le 4C, l'analyse des interactions entre une région d'intérêt et le reste du génome se fait par PCR inverse en utilisant des amorces spécifiques du locus d'intérêt puis par le séquençage des produits PCR. Pour le Hi-C, un résidu biotinylé est introduit avant ligation afin de purifier sélectivement les fragments chimères d'ADN, puis l'ensemble des produits est séquençé à haut débit. (b) Exemple de résultat de 4C-seq: Le viewpoint est localisé dans la région d'ADN rose. En bleu sont les régions avec lesquelles le viewpoint interagit en 3D. (c) Exemple de résultat de Hi-C : carte de contact d'une région du chromosome 1. Chaque locus interagit plus avec lui-même qu'avec le reste du génome, ce qui explique la présence d'une diagonale de forte intensité (flèches: exemple pour un locus particulier, en bleu, interaction d'un locus avec lui-même, en gris, interaction d'un locus avec une région distante de ~1Mb).

INTRODUCTION

la variante du FISH « Oligopaint », qui permet d'imager des régions d'ADN avec une résolution de l'ordre de quelques kilobases (Beliveau et al., 2017), cette technique ne permet pas d'avoir une vue d'ensemble des interactions chromatinienne entre elles à l'échelle du génome entier.

A2. Les techniques de capture de conformation de la chromatine

Afin de mieux comprendre l'organisation de l'ADN dans le noyau à l'échelle du génome entier et à haute-résolution, un autre type de technologie, complémentaire aux techniques d'imageries, a émergé : les techniques de capture de conformation de la chromatine. Elles reposent sur l'assomption que plus deux régions d'ADN sont proches dans l'espace via leur conformation 3D, plus elles vont générer fréquemment des contacts entre elles. Ces techniques permettent donc de mesurer sur une population la fréquence de contacts entre deux ou plusieurs régions d'ADN, reflet de leur organisation dans l'espace nucléaire.

En 2002 le laboratoire de Job Dekker a mis au point la technique de 3C pour « Chromosome Conformation Capture » (Figure 4a) (Dekker, 2002). Le 3C, dont le résultat final est révélé par PCR ou PCR-quantitative, indique la probabilité que deux régions d'intérêt connues interagissent ensemble, et donc leur proximité spatiale. Cette technique a révolutionné l'étude de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine mais elle a pour limite de ne révéler que les interactions entre deux régions connues.

C'est pourquoi plus tard ont été développés le 4C pour « 3C on Chip » (Simonis et al., 2006; Zhao et al., 2006) et le 4C-seq pour « Circular 3C suivi de séquençage haut-débit » (Figure 4a) (Gheldof et al., 2012; Matelot and Noordermeer, 2016). Que ce soit le 4C ou le 4C-seq, ces techniques similaires sont plus puissantes que le 3C puisqu'elles permettent d'analyser, par hybridation sur puce (« Chip » en anglais) ou par séquençage haut-débit toutes les interactions d'un locus d'intérêt avec le reste du génome. Le 4C-seq permet notamment de visualiser avec une très bonne résolution le profil d'interaction d'une région d'intérêt (Figure 4b). Cette technique possède cependant une limitation, celle de se focaliser sur les interactions d'une seule région d'intérêt.

Pour palier ceci, le laboratoire de Job Dekker a mis au point en 2009 la technique de Hi-C (Figure 4a,c) (Lieberman-Aiden et al., 2009). Cette technique novatrice également dérivée du 3C est basée sur les techniques de capture de conformation de la chromatine suivies de séquençage haut-débit. Le Hi-C est moins résolutif que le 4C-seq mais permet d'avoir une vue d'ensemble de l'organisation tridimensionnelle de l'ADN dans le noyau, à l'échelle du génome entier en analysant les interactions de toutes les régions d'ADN avec toutes les autres régions

INTRODUCTION

d'ADN du génome. A l'issue de cette expérience, les résultats peuvent être visualisés sous forme de matrices représentant le comptage des interactions d'un fragment d'ADN avec un autre fragment d'ADN (ou avec lui-même). Cette table peut se lire comme une heatmap où l'intensité de la couleur de chaque case correspond à la probabilité d'interaction d'un locus avec un autre locus d'ADN (Figure 4c).

Il existe également d'autres technologies dérivées du 3C comme le capture Hi-C, qui permet de capturer et de séquencer les interactions de quelques régions d'intérêt avec le reste du génome (Dryden et al., 2014). Cette technique est aussi résolutive que le Hi-C mais permet de séquencer le génome avec moins de profondeur puisqu'on se focalise sur seulement quelques régions d'intérêt.

Enfin il existe d'autres technologies pour analyser l'organisation 3D du génome comme par exemple le GAM (« Genome Architecture Mapping ») (Beagrie et al., 2017). Le GAM fonctionne de façon totalement différente des techniques de 3C ou de FISH. Il repose sur le séquençage d'ADN d'une section restreinte du noyau, non fixées au formaldéhyde. L'analyse de centaines de sections de noyaux différents permet d'établir à quelle fréquence les régions d'ADN étaient retrouvées ensemble dans une même section du noyau et donc à quelle fréquence ces régions d'ADN sont probablement proches dans l'espace nucléaire.

B. Les TAD (Topologically associating domains)

La visualisation des données de Hi-C sur des cellules humaines a permis de montrer en premier lieu que la probabilité d'interaction d'un locus d'ADN avec un autre diminue en fonction de sa distance génomique (Lieberman-Aiden et al., 2009). En effet, si l'on visualise l'interaction d'un fragment d'ADN avec lui-même, une diagonale rouge foncé apparaît alors (Figure 4c), qui perd en intensité lorsqu'on s'éloigne de la diagonale. Ce résultat illustre le fait qu'un locus d'ADN interagit beaucoup plus fortement avec lui-même qu'avec le reste du génome et plus avec ses locus voisins/adjacents qu'avec des locus situés à plusieurs mégabases (Mb). De même, un locus d'ADN interagit plus fortement avec des loci situés à plusieurs Mb sur la même molécule d'ADN qu'avec des loci situés sur un autre chromosome. Toutes ces observations illustrent l'effet de la distance génomique sur la probabilité de contact. Ceci démontre que l'ADN adopte des caractéristiques de polymère.

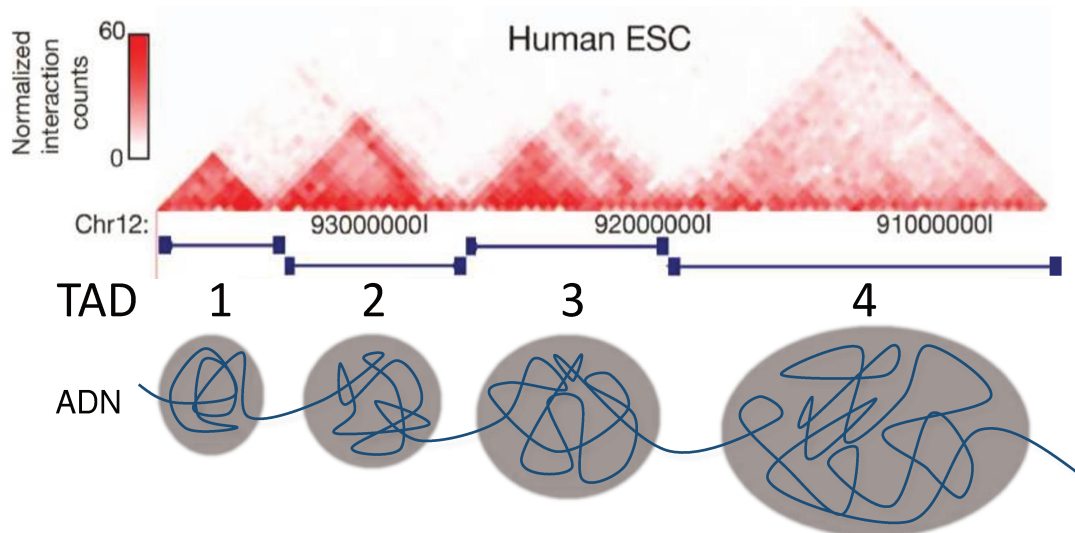
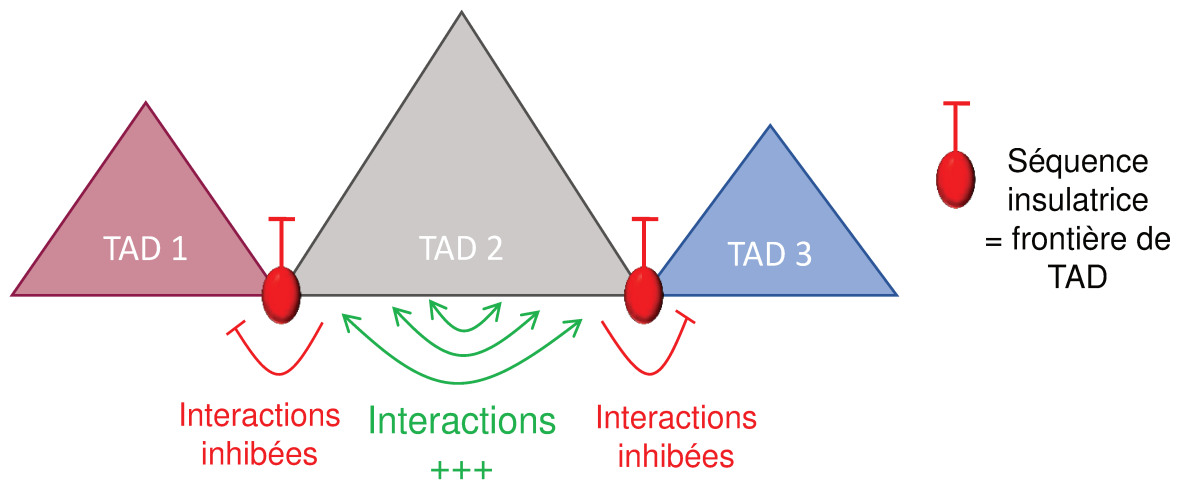
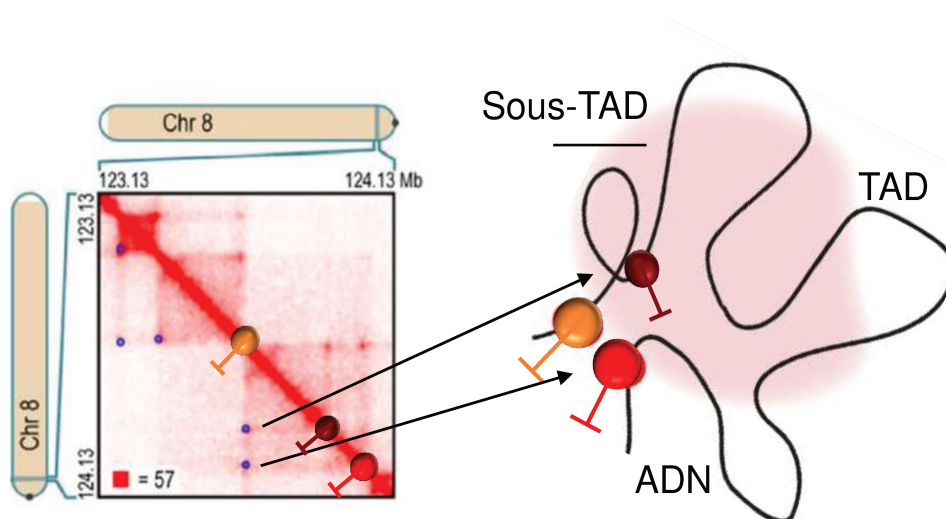
a**b****c**

Figure 5 : Les TAD (Topologically Associating Domains).

(a) Carte de Hi-C à une résolution de 20kb (La moitié de la carte seulement est représentée). Les triangles rouges apparaissant le long de la diagonale correspondent aux différents TAD partitionnant cette région du chromosome 12 (d'après Dixon et al., 2012). Ces TAD sont schématisés en dessous en bleu. (b) Schéma représentant les séquences insulatrices entre les TAD. Ces séquences favorisent les interactions intra-TAD et inhibent les interactions inter-TAD. (c) Carte Hi-C d'un locus situé sur le chromosome 8 et à 5kb de résolution réalisé dans des cellules CH12 (d'après Rao et al., 2014). Sur la carte de Hi-C, des boucles de chromatine sont observables grâce à la présence de pics rouges (entourés en bleu) au sommet des TAD et des sous-TAD. Chaque pic rouge correspond à l'interaction très forte entre 2 séquences insulatrices.

INTRODUCTION

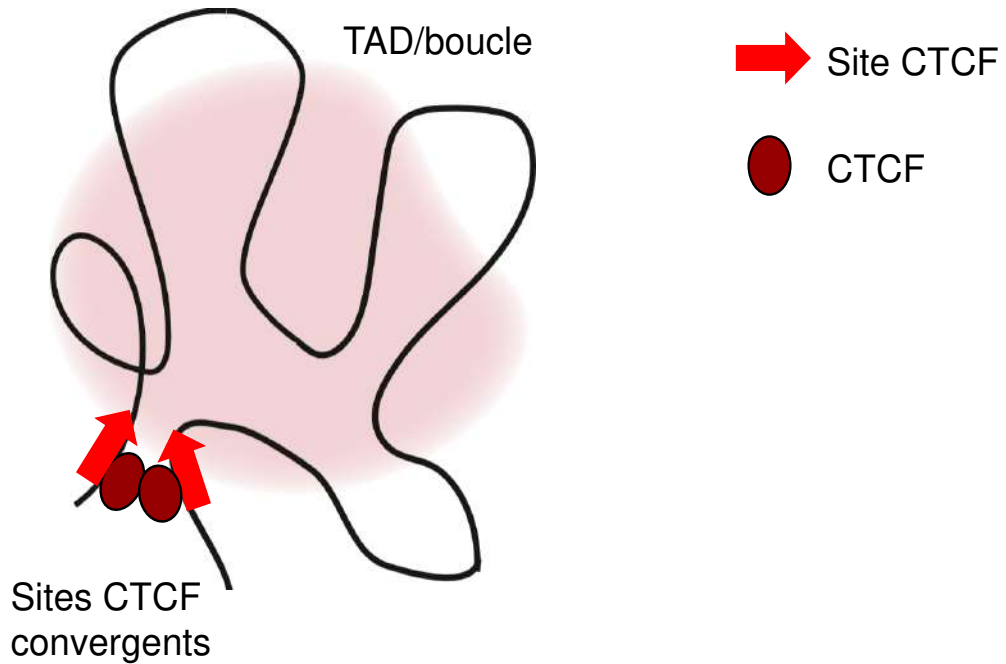
En 2012, des expériences de Hi-C ont été réalisées par le laboratoire de Bing Ren sur différentes lignées cellulaires humaines ou murines avec une résolution allant de 20 kb à 100 kb (= taille des loci observés) (Dixon et al., 2012). Cela a permis de révéler l'existence de domaines de chromatine au sein desquels il existe un enrichissement des interactions locales en *cis* et entre lesquels, les interactions sont inhibées (Sexton et al., 2012). Ces domaines d'interaction ont été appelés des TAD pour « Topologically Associating Domain » (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012). Ainsi, deux régions d'ADN séparées par une distance génomique donnée interagissent plus ensemble en trois dimensions si elles se trouvent dans un même TAD que si elles sont dans des TAD adjacents. Les TAD sont mis en évidence par l'inspection visuelle des cartes de contacts issues des expériences de Hi-C. En effet, ils sont visibles sous forme de triangles le long de la diagonale (Figure 5a). Les auteurs ont ainsi montré que 91% du génome de souris est partitionné en une succession de TAD et que ceux-ci peuvent comprendre de quelques dizaines de kilobases à 1 ou 2 Mb d'ADN (taille médiane de 880kb). Les TAD adjacents sont séparés par ce que l'on appelle des séquences insultrices ou frontières, qui permettent de fortement limiter les interactions entre deux TAD voisins (Figure 5b).

L'augmentation considérable de la profondeur de séquençage des Hi-C réalisés plus tard a permis d'obtenir des résolutions de l'ordre du kilobase. Cela a permis de voir apparaître des domaines d'interaction intra-TAD et donc plus petits que les TAD (taille médiane de 185kb) (Rao et al., 2014). Selon la résolution de l'expérience, l'algorithme et les seuils utilisés pour détecter les TAD à partir des matrices de Hi-C, ces nouveaux domaines peuvent être soit associés à des sous-TAD soit à des TAD à part entière. La découverte de ces structures 3D rend ainsi la définition d'un « TAD » plus ambiguë ainsi que dépendante de la résolution à laquelle les données de Hi-C sont analysées. Pour la suite de ce chapitre, le terme de « sous-TAD » sera utilisé.

L'augmentation de la résolution des Hi-C réalisés en 2014 a également pu montrer que l'interaction très forte entre les deux séquences insultrices d'un TAD et/ou d'un sous-TAD peut induire la formation d'une boucle de chromatine qui est visualisable sur la carte de contact comme un point de forte intensité au sommet du triangle correspondant (voir partie suivante) (Figure 5c) (Rao et al., 2014).

En conclusion, les TAD mettent en évidence une organisation tridimensionnelle de l'ADN dans l'espace, qui semble ubiquitaire sur le génome. Les TAD sont très bien conservés chez les mammifères (Dixon et al., 2012; Rao et al., 2014) et des domaines d'interactions en *cis* similaires sont également retrouvés chez d'autres organismes eucaryotes, tels que les

a



b

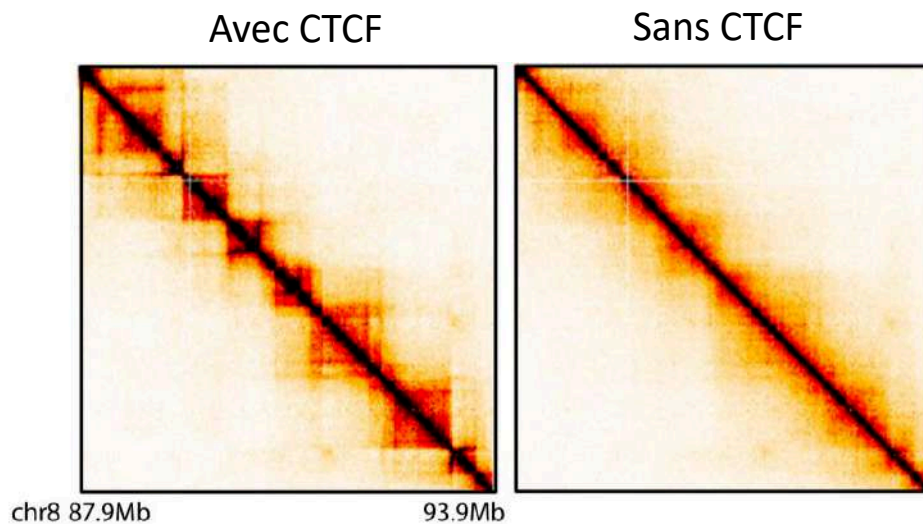


Figure 6 : Le rôle de CTCF dans la formation des boucles et frontières de TAD.

(a) La protéine CTCF se fixe sur des motifs d'ADN spécifiques appelés sites CTCF. L'orientation convergente de deux sites CTCF permet de former une boucle de chromatine formant un TAD ou un sous-TAD. (b) Carte de Hi-C obtenue dans des mESC avant et après dégradation de CTCF à une résolution de 20kb (d'après Nora et al., 2017). La dégradation de CTCF provoque une déstructuration des TAD et des frontières de TAD, conduisant à une perte de l'insulation entre les TAD adjacents.

INTRODUCTION

drosophiles ou les levures, bien que leurs tailles et leurs mécanismes de formation diffèrent (Sexton et al., 2012; Szabo et al., 2019).

Il est à noter que les TAD observés résultent d'une moyenne sur une population de cellules. Le single-cell Hi-C (Hi-C sur une cellule unique) a donc été développé pour étudier la variabilité entre cellules (Nagano et al., 2013). Bien que cette technique n'offre pas une bonne couverture du génome, elle a permis d'observer une certaine hétérogénéité des TAD entre les différentes cellules observées (Stevens et al., 2017). Cette hétérogénéité entre cellules peut, au moins en partie, être expliquée par le cycle cellulaire puisqu'elle est fortement atténuée dans des cellules synchronisées dans les différentes phases du cycle cellulaire (Nagano et al., 2017). En effet, on peut observer une perte des TAD en mitose et une réduction de leur insulation en phase S lors de la réplication. Il reste cependant une part d'hétérogénéité inexpliquée, qui soulève la question des mécanismes de formation des TAD. Il semble donc possible que les TAD soient des structures dynamiques, qui d'une cellule à l'autre peuvent être à des stades de formation différents.

B1. La formation des TAD, un mécanisme CTCF-dépendant

Pour comprendre la biologie des TAD, il est important d'étudier dans un premier temps les séquences insulatrices qui les séparent les uns des autres sur la fibre chromatinienne. Il a été montré que ces séquences insulatrices sont largement reconnues et fixées par la protéine insulatrice CTCF (CCCTC-binding factor) (Dixon et al., 2012). En effet, CTCF était initialement connu pour empêcher la communication entre un enhancer et son promoteur d'où son nom d'insulateur. Entre 75 à 95% des frontières de TAD sont associés à une fixation de CTCF selon le type cellulaire (Bonev et al., 2017; Dixon et al., 2012).

CTCF est une protéine qui peut se lier à l'ADN grâce à sa structure en « doigt de zinc ». CTCF reconnaît une séquence spécifique présente sur l'ADN, dit motif CTCF, et s'y fixe avec une haute-affinité (Phillips and Corces, 2009). La liaison de CTCF à l'ADN est donc orientée, la séquence reconnue pouvant être dans un sens « forward » ou dans un sens « reverse ». Néanmoins, sa fixation sur ses sites ne suffit pas à créer une frontière de TAD puisque CTCF se fixe sur des dizaines de milliers de sites sur l'ADN, pas nécessairement impliqués dans des frontières de TAD (Nora et al., 2012).

De façon intéressante, les sites reconnus par CTCF qui sont orientés de façon convergente, c'est-à-dire un site orienté « forward » et un site orienté « reverse » sont préférentiellement utilisés pour former une boucle de chromatine (Figure 6a) (de Wit et al., 2015). Cela

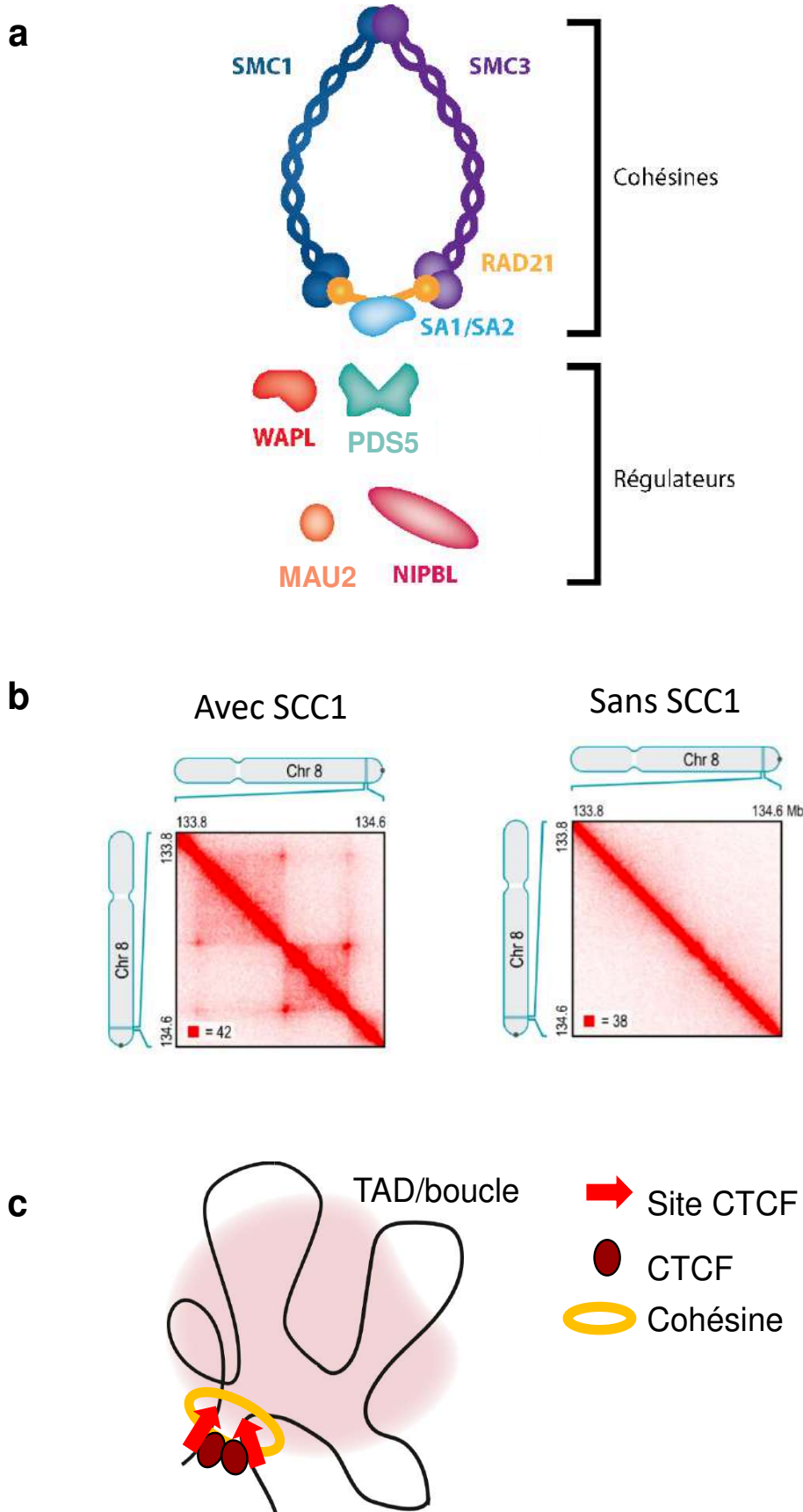


Figure 7 : Le rôle des cohésines dans la formation des frontières de TAD.

(a) Le complexe des cohésines s'assemble en un anneau tri-partite composé des sous-unités ATPasiques SMC1 et SMC3, ainsi que de la protéine SCC1. L'anneau de cohésine est régulé par de nombreux facteurs qui modulent son association avec la chromatine (d'après Couturier et al., 2016). (b) Carte de Hi-C à une résolution de 5kb avant et après dégradation de SCC1 dans des HCT116 (d'après Rao et al., 2017). La dégradation de cette sous-unité des cohésines provoque une dissolution complète des TAD. (c) Modèle proposant comment les cohésines pourraient permettre de maintenir deux régions de chromatine proche, formant la frontière d'une boucle/TAD.

INTRODUCTION

expliquerait pourquoi tous les sites de fixation de CTCF ne sont pas impliqués dans la formation d'un TAD. D'ailleurs, une inversion du sens d'un des deux sites CTCF engagé dans une boucle de chromatine peut conduire à la disparition de cette boucle (de Wit et al., 2015).

Dans une étude de 2017, le laboratoire de Benoit Bruneau a montré à l'échelle du génome entier, que la dégradation contrôlée de CTCF à l'aide d'un degron (CTCF-AID) conduit à une perte drastique des TAD et des boucles qui les forment (Figure 6b) (Nora et al., 2017). Une autre étude a pu préciser que la dégradation de CTCF n'empêchait pas les interactions entre loci voisins mais la formation des frontières des TAD (Wutz et al., 2017). Ceci démontre que la fixation de CTCF sur ses sites est nécessaire pour la formation des TAD et de leurs frontières.

B2. La formation des TAD, un mécanisme dépendant des cohésines

Dès 2008, il a été proposé que les protéines cohésines participent à l'insulation exercée par CTCF même si la façon dont ces protéines réalisent cette insulation n'était pas encore entièrement élucidée (Wendt et al., 2008).

La cohésine est un complexe protéique en forme d'anneau tri-partite très bien conservé de la levure à l'homme (Figure 7a) (Moronta-Gines et al., 2019). L'anneau est formé par les sous-unités ATPases SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) : SMC1 et SMC3. La protéine SCC1 (ou Rad21) connecte les deux SMC et ferme l'anneau. Une 4^{ème} sous-unité du complexe : SA1 ou SA2 selon le complexe, s'associe avec SCC1 et a un rôle de régulation. D'autres protéines peuvent s'associer à ce complexe de façon transitoire pour réguler l'association du complexe avec l'ADN (NIPBL, MAU2, WAPL, PDS5...). Des mutations des sous-unités des cohésines sont connues pour provoquer des maladies appelées « cohésinopathies » ou des cancers (Piché et al., 2019; Song and Kim, 2017).

Les cohésines ont initialement été découvertes pour leur rôle de cohésion des chromatides sœurs afin d'assurer la bonne ségrégation du génome durant la division cellulaire. Cependant, le fait qu'elles soient exprimées et fixées à la chromatine durant la phase G1 du cycle cellulaire laissait entrevoir un rôle additionnel de ce complexe protéique (Wendt et al., 2008).

Les sites de fixation des cohésines sur l'ADN sont souvent les mêmes que ceux reconnus par CTCF, c'est-à-dire avec un biais vers les régions accessibles et transcriptionnellement actives (Parelho et al., 2008). En effet, les cohésines sont retrouvées par ChIP sur 90% des sites occupés par CTCF (Wendt et al., 2008). D'ailleurs, l'occupation de CTCF semble nécessaire

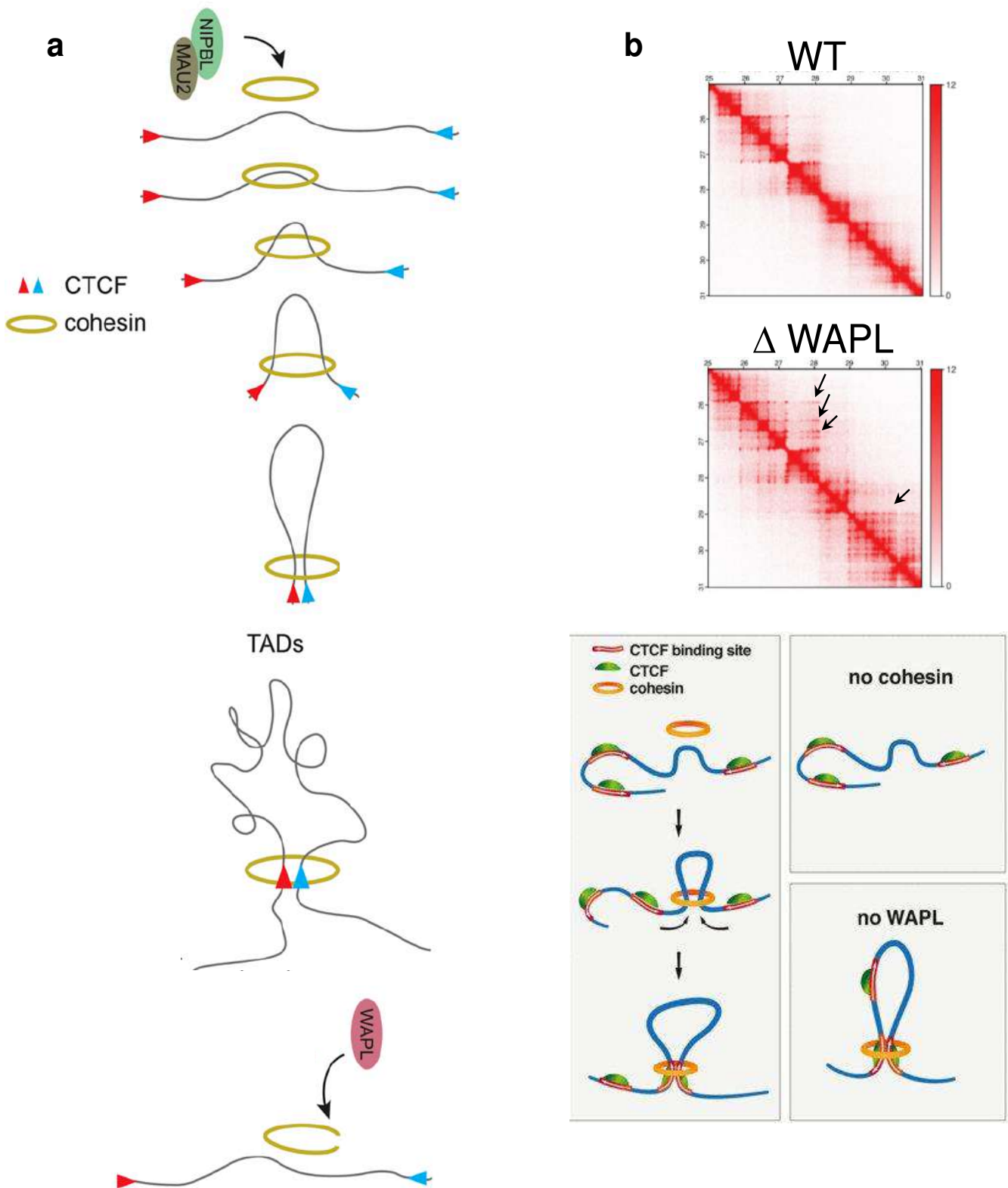


Figure 8 : Le modèle de la loop extrusion.

(a) Selon ce modèle, l'anneau de cohésines entoure l'ADN pour former une boucle puis progresse de manière bidirectionnelle le long de l'ADN afin d'allonger la boucle au fur et à mesure. Le processus de loop extrusion ne s'arrête de progresser que lorsqu'il rencontre deux sites CTCF convergents, formant ainsi la frontière du TAD (d'après Bracciolo et al., 2019). Ce processus est très dynamique puisque les cohésines sont régulièrement enlevées de l'ADN par WAPL. (b) Carte de Hi-C à une résolution de 20kb avant et après délétion de WAPL dans des cellules HAP1 (d'après Haarhuis et al., 2017). La déplétion de WAPL augmente le temps de résidence des cohésines sur l'ADN et, en accord avec le modèle de loop extrusion, induit la formation de boucles plus longues (flèches noires) (d'après Wutz et al., 2017).

INTRODUCTION

à l'accumulation des cohésines sur ces sites, potentiellement grâce à une interaction directe entre les deux protéines (Rubio et al., 2008), notamment sur les sites CTCF convergents qui sont situés aux frontières des TAD (Nora et al., 2012; Rao et al., 2014; Wendt et al., 2008).

En 2017, des études se sont intéressées au rôle des cohésines dans la formation des TAD. La dégradation de SCC1 à l'aide d'un degron chez l'homme ou la délétion de NIPBL (protéine qui permet le chargement des cohésines sur l'ADN) chez la souris induisent une dissolution complète des TAD (Figure 7b) (Rao et al., 2017; Schwarzer et al., 2017; Wutz et al., 2017). Ces études ont ainsi permis de prouver pour la première fois le rôle des cohésines dans la formation des TAD. De plus, ces études montrent que la formation des TAD est très dynamique puisque les TAD disparaissent seulement 15 min après la dégradation de SCC1 (Wutz et al., 2017), et réapparaissent 20-40 min après la réexpression de SCC1 (Rao et al., 2017).

Dans l'ensemble, ces études suggéraient que les cohésines étaient recrutées au niveau de sites CTCF convergents fixés par CTCF, et que leur forme d'anneau permettait de capter deux régions d'ADN distantes formant ainsi une boucle et donc une frontière de TAD (Figure 7c). Cependant ce modèle n'explique pas réellement les interactions fortes qui existent à l'intérieur des TAD, et pas seulement entre leurs deux frontières, appelées aussi ancrées de boucle.

B3. Le modèle de la « loop extrusion »

Il a alors été proposé le modèle de la « loop extrusion », ou extrusion de boucle initialement basé sur des simulations. Selon ce modèle, l'anneau de cohésines, déposé sur l'ADN grâce à NIPBL, entourerait l'ADN pour former une boucle sur une région de l'ADN puis progresserait de manière bidirectionnelle le long de l'ADN afin d'allonger la boucle au fur et à mesure et ne s'arrêterait de progresser que lorsqu'il aurait rencontré deux sites CTCF convergents, formant ainsi la frontière du TAD (Figure 8a) (Fudenberg et al., 2016; Sanborn et al., 2015). Ce modèle pourrait ainsi largement expliquer les triangles que l'on observe sur les cartes de Hi-C, c'est à dire les interactions existantes au sein des TAD puisqu'en progressant le long de l'ADN à l'intérieur du TAD, l'anneau de cohésines mettrait à proximité à l'intérieur de son anneau, les différentes régions d'ADN formant le TAD.

En accord avec ce modèle, il a été montré *in vitro* que le complexe des condensines de levure, qui est très similaire au complexe de cohésines au niveau de sa structure et de sa composition (protéines SMC) et qui permet de condenser les chromosomes en mitose, est capable de réaliser de la loop extrusion de façon ATP-dépendante (Ganji et al., 2018). De façon

INTRODUCTION

intéressante, ce phénomène de loop extrusion peut également être réalisé de façon asymétrique ou monodirectionnelle. Cela signifie qu'un côté de l'ADN continue à être extrudé à travers l'anneau de cohésines tandis que l'autre côté est bloqué.

En 2019, fut finalement démontré *in vitro* que des cohésines humaines sont également capables de réaliser de la loop extrusion, uniquement en présence d'ATP et de NIPBL et MAU2, les protéines permettant de charger l'anneau de cohésines sur l'ADN (Davidson et al., 2019; Kim et al., 2019). D'après ces études, les cohésines sont capables d'extruder de l'ADN progressivement à une vitesse de 0,5 à 1kb/s, ce qui est extrêmement rapide. De façon intéressante, le laboratoire de Jan-Michael Peters a montré également que NIPBL et MAU2 ne sont pas seulement nécessaires pour charger les cohésines sur l'ADN mais également pour que le phénomène de loop extrusion se poursuive correctement. En effet, un retrait de ces protéines durant le processus de loop extrusion *in vitro* interrompt ce processus déjà engagé par les cohésines (Davidson et al., 2019). Les travaux du laboratoire de Hongtao Yu, quant à eux, suggèrent que l'anneau de cohésines et NIPBL formerait un dimère fonctionnel dans le processus de loop extrusion (Kim et al., 2019). Il est possible que NIPBL et/ou MAU2 favorisent l'utilisation de l'ATP par les cohésines ou encore qu'ils empêchent le décrochage de l'anneau de l'ADN. Cette dernière hypothèse est soutenue par le rôle démontré de SCC2 (l'homologue de NIPBL chez la levure) dans le maintien des cohésines sur la chromatine en G1 (Srinivasan et al., 2019). Par contre, les analyses *in vitro* n'ont pas mis en évidence de processus de loop extrusion unidirectionnelle pour le complexe cohésine, comme cela avait été observé pour les condensines *in vitro* (Ganji et al., 2018).

Le modèle de loop extrusion est également soutenu par le fait que la déplétion des protéines WAPL et/ou PDS5, protéines connues pour dissocier l'anneau de cohésines de l'ADN, induit la formation de boucles plus grandes (Figure 8b) (Haarhuis et al., 2017; Wutz et al., 2017). En effet, en augmentant le temps de résidence des cohésines sur l'ADN, celles-ci pourraient continuer le phénomène de loop-extrusion plus loin sur l'ADN, formant ainsi des TAD plus grands. Cependant, la façon dont les cohésines outrepasseraient les sites CTCF convergents dans ces conditions est encore mal comprise. Il est possible que les cohésines soient déjà capables dans certaines cellules de dépasser les premiers sites CTCF convergents et de progresser jusqu'aux suivants dans des conditions normales (Chang et al., 2020), et que ce phénomène soit renforcé et donc plus visible sur la moyenne de la population lorsque le temps de résidence des cohésines sur l'ADN est prolongé.

Enfin, grâce à des expériences de Hi-C possédant une très bonne résolution, il a été mis en évidence la formation de « stripes » (ou bandes en français) sur les cartes de Hi-C (Vian et

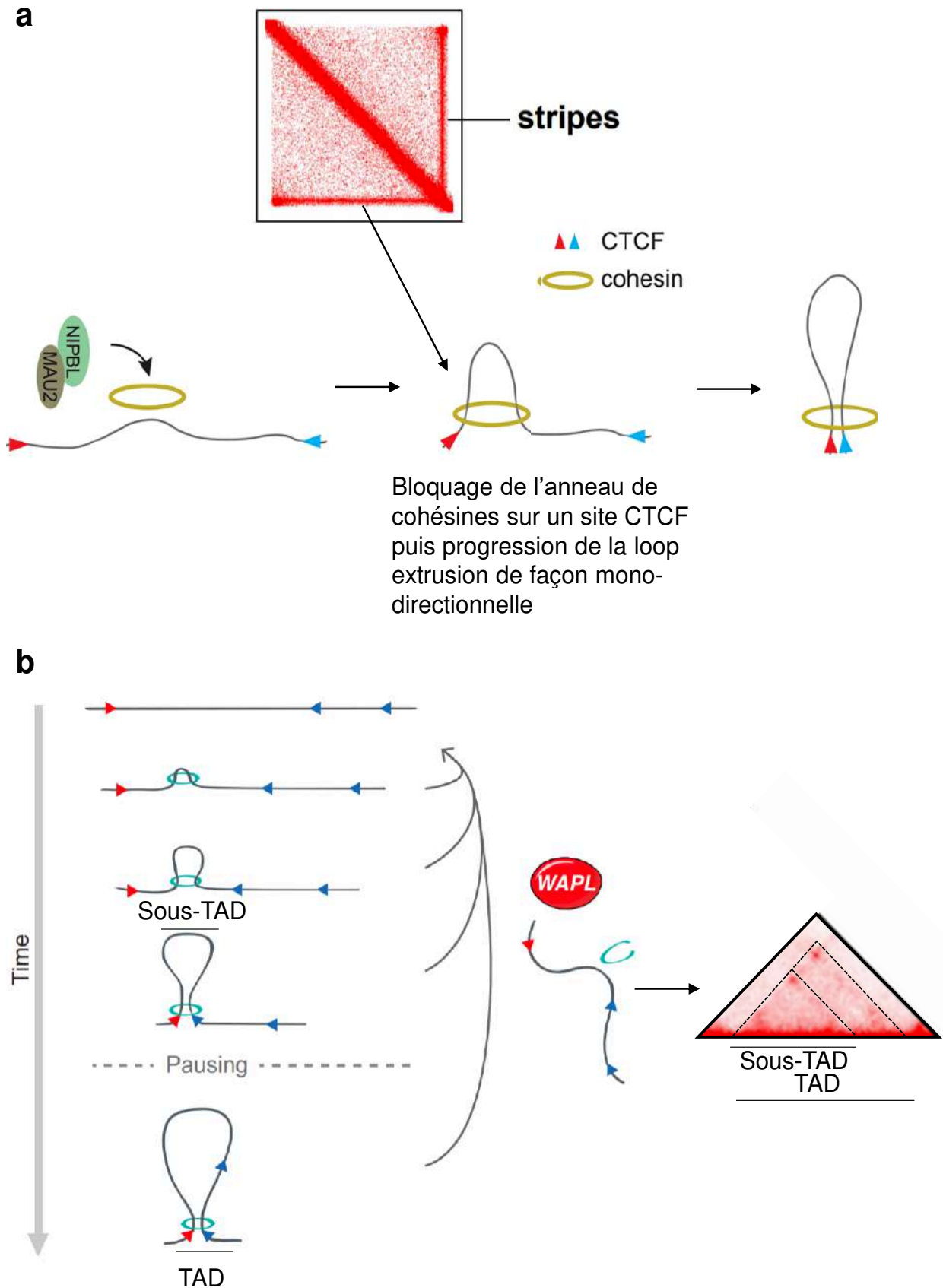


Figure 9: La loop extrusion à l'origine de la formation des TAD.

(a) La formation de stripes sur les cartes de Hi-C reflète les cas où un anneau de cohésines aurait été chargé près d'un site CTCF et extruderait de l'ADN d'un seul côté car il serait bloqué par le site CTCF de l'autre. Ce locus d'ADN près de la frontière de TAD interagirait alors lui-même avec tout le reste du TAD formant ainsi une ligne d'interaction de forte intensité (d'après Vian et al., 2018 et Bracciolo et al., 2019). (b) Les TAD observés en Hi-C sont une moyenne sur la population et sont des probalement des structures très dynamiques. Il est possible que les cohésines s'arrêtent aux premiers sites CTCF convergents rencontrés dans certaines cellules (formant un sous-TAD) alors que dans d'autres cellules, elles progressent jusqu'au sites CTCF convergents suivants, formant le TAD (d'après Haarhuis et al., 2017).

INTRODUCTION

al., 2018). Ces stripes sont caractéristiques d'un phénomène de loop extrusion unidirectionnel, en reflétant les cas où un anneau de cohésines est chargé près d'un site CTCF et extrude de l'ADN d'un seul côté, étant bloqué par un site CTCF de l'autre. Ce locus d'ADN près de la frontière de TAD interagit alors lui-seul avec tout le reste du TAD formant ainsi une ligne d'interaction de forte intensité (Figure 9a). Cette notion sera très importante pour la partie résultats de ce manuscrit.

De façon importante, ce modèle de loop extrusion expliquerait également la présence de sous-TAD (Rao et al., 2014). En effet, il est fort probable que dans la population observée par une expérience de Hi-C, dans certaines cellules le phénomène de loop extrusion soit stoppé aux premiers sites CTCF convergents rencontrés, formant un petit TAD (précédemment imaginé comme un sous-TAD). Au contraire, dans une majorité des cellules de la population, la loop extrusion pourrait être ralentie aux premiers sites CTCF convergents rencontrés mais continue de progresser jusqu'aux sites CTCF convergents suivants avant de s'arrêter, formant un TAD plus grand (Chang et al., 2020).

En conclusion, la visualisation des cartes de Hi-C à haute-résolution permet d'observer une organisation 3D moyenne sur des cellules à un instant donné, capturant un ensemble de boucles en cours d'extrusion. Dans ce modèle les frontières des TAD qui apparaissent en moyenne représentent des sites de « pause » de la loop extrusion de plus ou moins grande efficacité. Cela expliquerait également la variation inter-cellulaire observée en single-cell Hi-C ou en microscopie (Figure 9b) (Stevens et al., 2017).

B4. Le rôle des TAD dans les processus biologiques

Le génome entier étant organisé en une succession de TAD, il apparaît évident que ces TAD ne soient pas neutres dans les divers processus biologiques : transcription, réplication ou réparation.

- La relation entre les TAD et la transcription

Il était connu depuis longtemps que les cohésines et CTCF étaient impliqués dans la régulation de la transcription mais les mécanismes alors mis en jeu étaient mal compris avant la découverte des TAD.

Il était cependant déjà proposé que les enhanceurs pouvaient activer l'expression de leurs gènes cibles, parfois distants, grâce à une boucle de chromatine entre enhanceur et promoteur (Wendt and Peters, 2009). La caractéristique des TAD étant de promouvoir les interactions

INTRODUCTION

d'ADN en son sein et d'inhiber les interactions avec les TAD voisins, il a été supposé que cela pourrait avoir un rôle sur les contacts/boucles entre les enhancers et leurs promoteurs. D'ailleurs, il a été montré qu'une délétion de frontière de TAD, dans des cellules de patients possédant une malformation des membres, entraîne des contacts ectopiques entre un enhancer et des gènes normalement inactifs situés dans des TAD voisins (Lupiáñez et al., 2015). Ce contact inexistant dans les cellules normales conduit ainsi à l'activation de ces gènes et donc à l'apparition de malformations durant le développement. Par ailleurs, au cours de la différenciation de cellules ES de souris, les gènes se trouvant dans un même TAD voient leur expression co-réglée de la même façon, démontrant ainsi que les TAD sont des unités très importantes pour la régulation de la transcription (Nora et al., 2012).

De plus, la dégradation de Rad21 ainsi que la délétion de NIPBL chez les mammifères, ont montré que l'expression des gènes est affectée par la dissolution des TAD. Cependant, seulement 13% des gènes voient leur expression modifiée d'un facteur 2 ou plus, indiquant que l'effet des TAD sur la transcription n'est pas aussi fort que supposé précédemment, et ne concerne pas tous les gènes (Rao et al., 2017; Schwarzer et al., 2017). De la même façon, des expériences de Hi-C et de RNA-seq ont été réalisées dans des drosophiles contenant des chromosomes balanceurs possédant de nombreux réarrangements (inversions, délétions, duplications). Tandis que ces réarrangements ont un fort impact sur l'organisation 3D du génome, ils n'ont un effet que très subtil sur l'expression des gènes (Ghavi-Helm et al., 2019).

A l'inverse, la transcription semble impliquée dans la formation des TAD. En effet, la fixation de CTCF sur l'ADN n'est probablement pas le seul mécanisme de formation des frontières de TAD puisque suite à la dégradation de CTCF, 20% des TAD demeurent intacts. De nombreuses frontières de TAD sont enrichies en gènes, notamment en gènes de ménage, que ce soit en présence de CTCF ou non (Dixon et al., 2012). De façon intéressante, il existe une corrélation entre l'activité transcriptionnelle d'un gène et sa capacité à former une frontière de TAD (Bonev et al., 2017; Sexton and Cavalli, 2015; Zhang et al., 2019). Le laboratoire de Giacomo Cavalli a pu montrer que certains gènes, induits au cours de la différenciation cellulaire, peuvent devenir de nouvelles frontières de TAD, et ce, de façon indépendante de CTCF. Cependant, l'activation transcriptionnelle d'un gène n'entraîne pas la formation d'une nouvelle zone d'insulation, indiquant que la transcription d'un gène à elle seule ne suffit pas pour créer une nouvelle frontière. Les auteurs ont alors proposé que les facteurs de transcription recrutés au niveau des gènes actifs participeraient à ce rôle d'insulation. D'autre

INTRODUCTION

part, il a été montré que les cohésines s'accumulent plus particulièrement entre les gènes dont la transcription est orientée de façon convergente et ce, de façon dépendante de la transcription (Busslinger et al., 2017; Lengronne et al., 2004). Une autre possibilité serait donc que les gènes convergents, en bloquant les cohésines dans leur région 3', potentiellement à cause des contraintes topologiques générées par la machinerie de transcription, bloquent la loop extrusion et permettent la création d'une frontière de TAD.

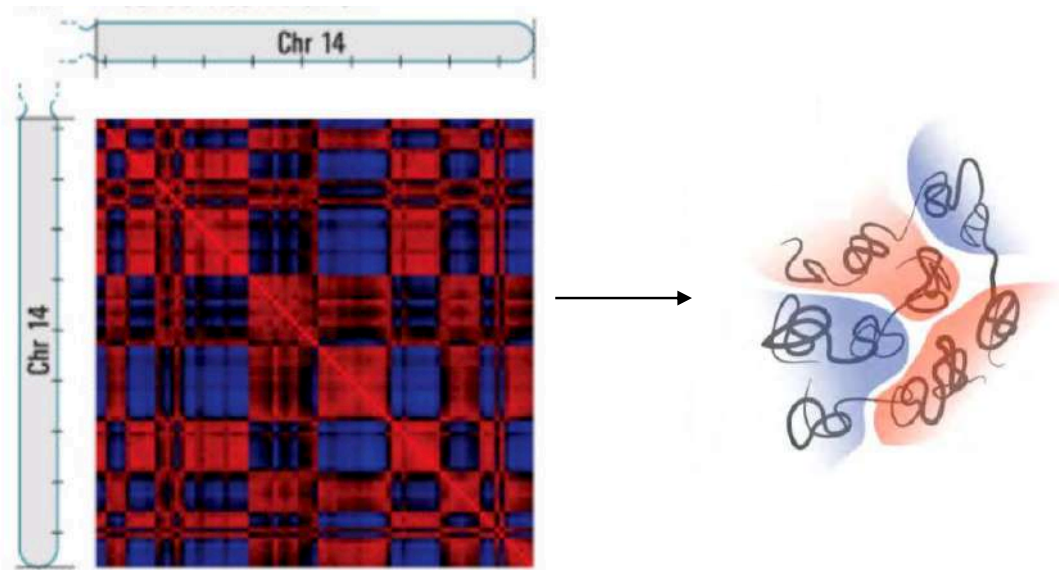
- La relation entre les TAD et la réplication

De façon intéressante, les cohésines peuvent interagir avec le complexe de pré-réplication (pre-RC) et leur déplétion ralentit le processus de réplication, de façon indépendante de leur rôle dans la cohésion des chromatides sœurs (Guillou et al., 2010). Cela suggère donc un rôle des cohésines dans la réplication potentiellement via leur rôle dans l'organisation du génome en 3D.

D'autre part, il est connu que les différentes régions du génome ne se répliquent pas au même moment de la phase S. En effet, certaines régions commencent à se répliquer au tout début de la phase S, généralement les régions actives, tandis que d'autres se répliquent beaucoup plus tardivement, généralement les régions réprimées. Ce phénomène s'appelle le programme de « replication timing » (Marchal et al., 2019). De façon intéressante, les frontières entre ces domaines qui ne se répliquent pas au même moment de la phase S correspondent aux frontières des TAD (Pope et al., 2014). De plus, la protéine RIF1, en se fixant sur les domaines répliqués tardivement permet de respecter le « replication timing » en inhibant les interactions entre les domaines répliqués précocement et les domaines répliqués tardivement (Foti et al., 2016). Cela indique que les TAD sont des unités fonctionnelles de la réplication. Néanmoins, l'intégrité des frontières de TAD ne semblent pas affecter le programme de « replication timing » (Sima et al., 2019). Il semblerait donc que ce soit des locus intra-TAD possédant des caractéristiques d'enhancer et qui interagissent entre eux qui soient responsables de la réplication précoce des domaines dans lesquels ils se trouvent.

Bien qu'il existe déjà un faisceau d'observations assez large concernant le rôle des TAD et des boucles de chromatine dans la transcription et quelques observations dans la réplication, le rôle de ces derniers dans la réparation de l'ADN n'est encore que peu caractérisé.

a



b

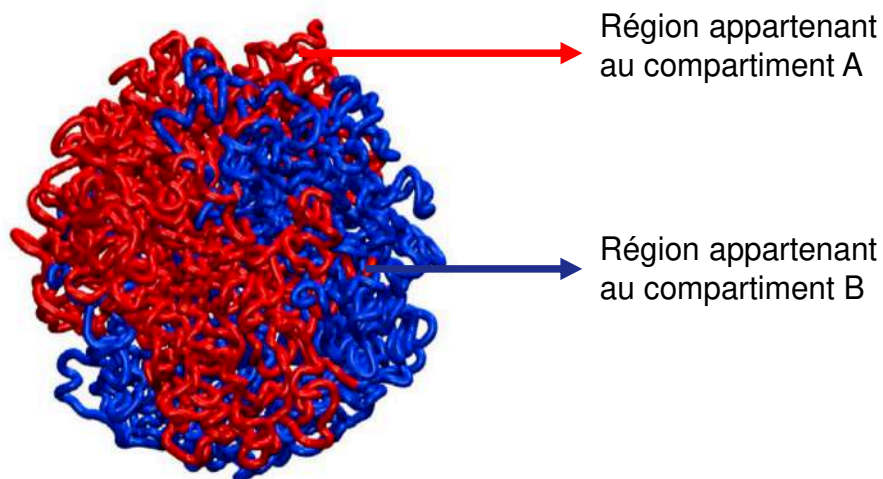


Figure 10 : Les compartiments A et B.

(a) La normalisation d'une carte de Hi-C par la distance (observed/expected) fait apparaître deux populations de régions de chromatine : le compartiment A et le compartiment B. Les régions de chaque compartiment interagissent entre elles mais n'interagissent pas ou peu avec les régions de l'autre compartiment (cellules GM06990, d'après Lieberman-Aiden et al., 2009). (b) Exemple de simulation de la compartimentation de la chromatine en compartiments A et B (d'après Rao et al., 2017).

C. Les compartiments A et B

Il existe un niveau d'organisation supérieur de la chromatine au-delà des TAD. En effet, afin de s'affranchir de l'effet de la distance génomique sur la probabilité de contact entre les régions d'ADN, les tables de contact issues des données de Hi-C ont été normalisées par rapport à la distance génomique. Avec une faible résolution de 1Mb, ces données ont permis de voir apparaître une matrice avec un profil quadrillé de deux couleurs, appelé « plaid pattern » (Figure 10a) (Lieberman-Aiden et al., 2009). Cela signifie que même si certaines régions d'ADN ne sont pas proches sur la séquence d'ADN, elles sont capables de générer des contacts longue-distance, voir inter-chromosomiques et sont donc proches dans l'espace. Il se dégage alors deux catégories, nommées de manière arbitraire compartiments A et B, au sein desquelles les contacts sont favorisés. Ces contacts sont cependant inhibés entre les deux catégories. En conclusion, ces résultats montrent que la totalité du génome est partitionné en régions qui se répartissent sur deux compartiments spatiaux dans le noyau (Figure 10b). Les compartiments A et B sont relativement stables d'une cellule à l'autre, contrairement aux TAD (Stevens et al., 2017).

En comparant les régions d'ADN des deux compartiments à leur teneur en modifications post-traductionnelles des histones, caractéristiques d'une chromatine ouverte ou fermée, les auteurs ont montré que le compartiment A est d'avantage associé à une chromatine plus ouverte et donc plus actif transcriptionnellement que le compartiment B (Sexton and Yaffe, 2015). Le compartiment B, quant à lui, montre une teneur en contacts plus importante, signe d'une chromatine plus compactée, plus fermée. Ainsi, le compartiment A correspondrait plutôt à de l'euchromatine et le B d'avantage à de l'hétérochromatine (Rao et al., 2014).

Enfin, ces deux compartiments peuvent être catégorisés plus finement en cinq sous-compartiments lorsque les données sont observées avec une meilleure résolution (25kb) : A1, A2, B1, B2 et B3 (Rao et al., 2014). Ces sous compartiments présentent chacun des caractéristiques chromatiniennes particulières. Par exemple, tandis que les sous-compartiments A1 et A2 possèdent des marques d'euchromatine active, B1 possède des marques associées à une hétérochromatine facultative (enrichissement de H3K27me3 et déplétion de H3K36me3), B2 à l'hétérochromatine péri-centromérique et B3 à une hétérochromatine constitutive.

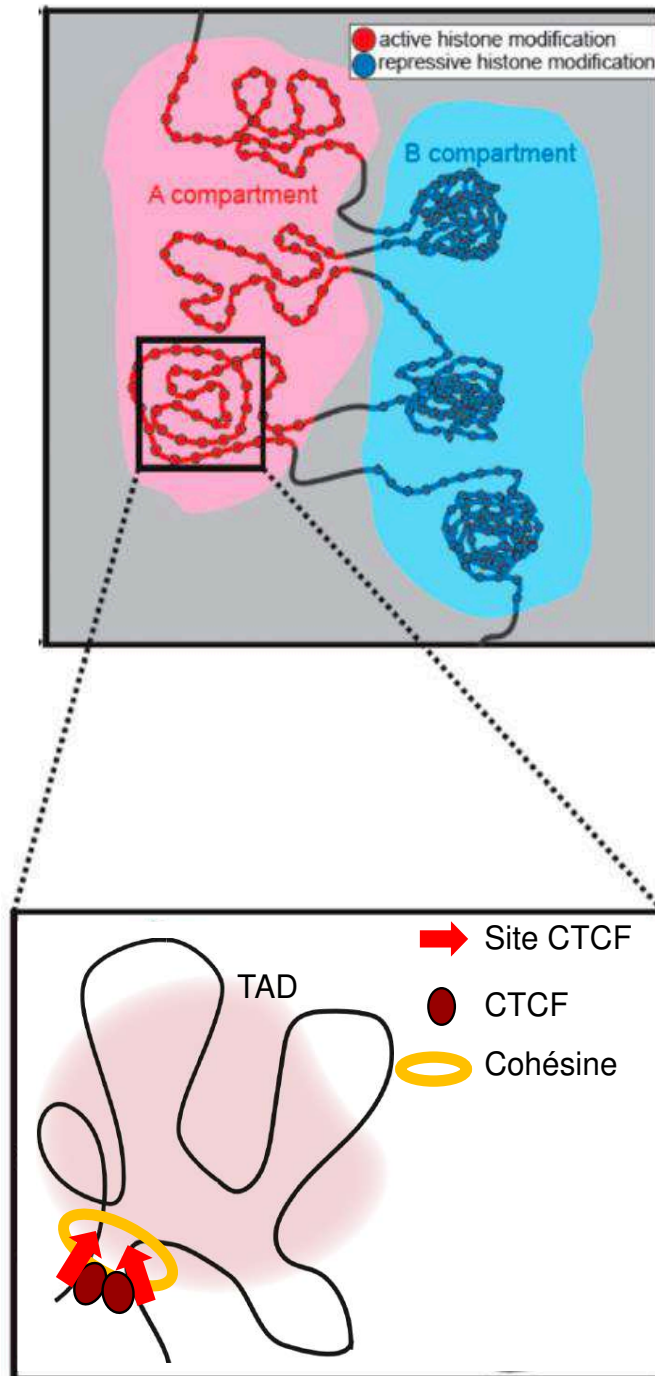


Figure 11 : Les compartiments, le niveau supérieur d'organisation des TAD en 3D.

Les TAD possédant une chromatine composée de marques d'histones similaires interagissent entre eux dans le noyau formant des compartiments distincts (d'après Li et al., 2019). Les TAD enrichis en modification d'histones actives (signe d'une chromatine ouverte) se regroupent en un compartiment A, tandis que les TAD enrichis en modification d'histones répressives (signe d'une chromatine fermée) se regroupent en un compartiment B.

INTRODUCTION

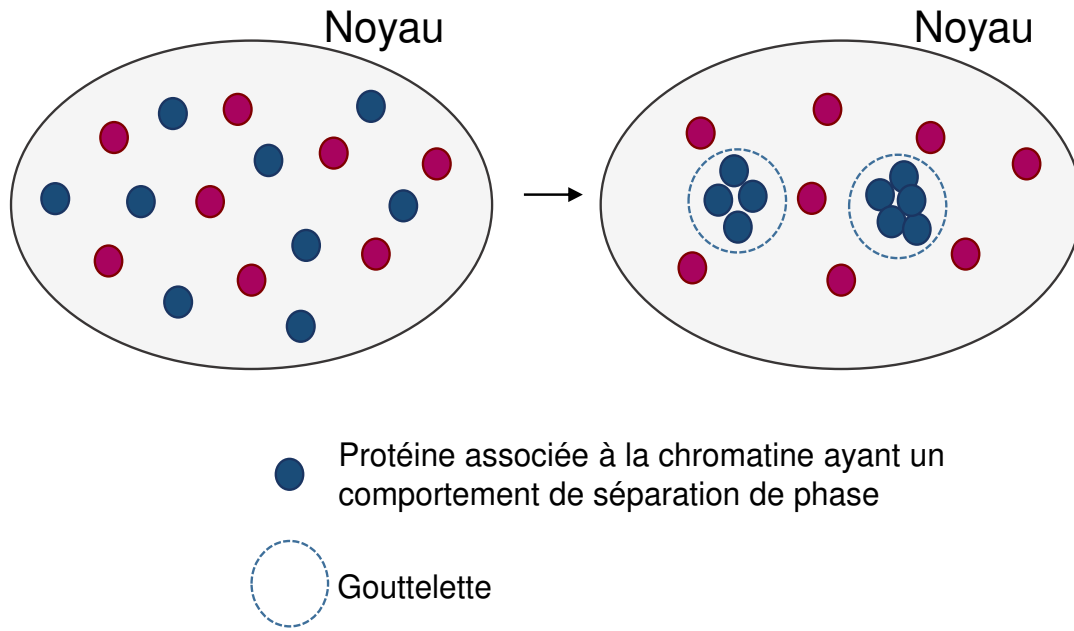
C1. Lien entre les compartiments et les TAD et avec la séparation de phase

Les frontières entre différents TAD corrèlent avec les démarcations entre les compartiments A et B suggérant que ces compartiments sont constitués de différents TAD. Les compartiments A et B seraient donc le niveau d'organisation supérieur des TAD en permettant aux TAD qui possèdent des caractéristiques chromatiniennes similaires (modifications post-traductionnelles des histones/ compaction) d'interagir entre eux dans le noyau (Figure 11).

Néanmoins, il est à noter qu'une dissolution des TAD, grâce à la dégradation de CTCF, n'a pas d'effet significatif sur les compartiments A et B (Nora et al., 2017). Une autre étude a montré que la délétion de NIPBL, protéine impliquée dans le chargement des cohésines sur l'ADN, ou bien la dégradation de SCC1 conduit également à une dissolution des TAD, alors qu'au contraire elle induit une meilleure compartimentation de la chromatine (Haarhuis et al., 2017; Rao et al., 2017; Schwarzer et al., 2017; Wutz et al., 2017). En effet, lorsque la formation des TAD est inhibée, on observe une ségrégation plus fine des régions de chromatine dans les compartiments A et B en fonction de leurs modifications post-traductionnelles des histones. Cela peut s'expliquer par le fait que les TAD, lorsqu'ils sont présents, forcent l'interaction de régions génomiques proches, indépendamment de leur composition en marques d'histones. A l'inverse, une augmentation de la loop extrusion grâce à la déplétion de WAPL et de PDS5 inhibe fortement la compartimentation de la chromatine (Wutz et al., 2017). Ces résultats indiquent que les TAD et les compartiments A/B ne sont pas formés de la même façon. Au contraire, cela suggère qu'il y ait une compétition entre les mécanismes actifs de formation des TAD par loop extrusion et la formation, potentiellement plus passive, des compartiments (Nuebler et al., 2018).

Il a d'ailleurs été proposé que les compartiments seraient formés grâce à un phénomène de séparation de phase (Stam, 2019). La séparation de phase correspond à la séparation physique entre deux liquides non miscibles en deux phases différentes (comme par exemple les deux phases formées par l'eau et l'huile lorsqu'elles sont mélangées). Certaines protéines aux propriétés physico-chimiques similaires peuvent avoir tendance à interagir physiquement et donc à se regrouper au sein du noyau. Une forte quantité de protéines associées à la chromatine pourrait provoquer la formation de gouttelettes aux propriétés physico-chimiques différentes de celles du reste du nucléoplasme, et donc isolées de celui-ci (Figure 12). Les compartiments A/B ayant des compositions protéiques différentes, il serait envisageable que leur composition entraîne un phénomène de séparation de phase. Il a par ailleurs été démontré que la formation de l'hétérochromatine est due à un phénomène de séparation de phase, qui pourrait être dû à la présence de la protéine HP1 (Larson et al., 2017; Strom et al., 2017).

a



b

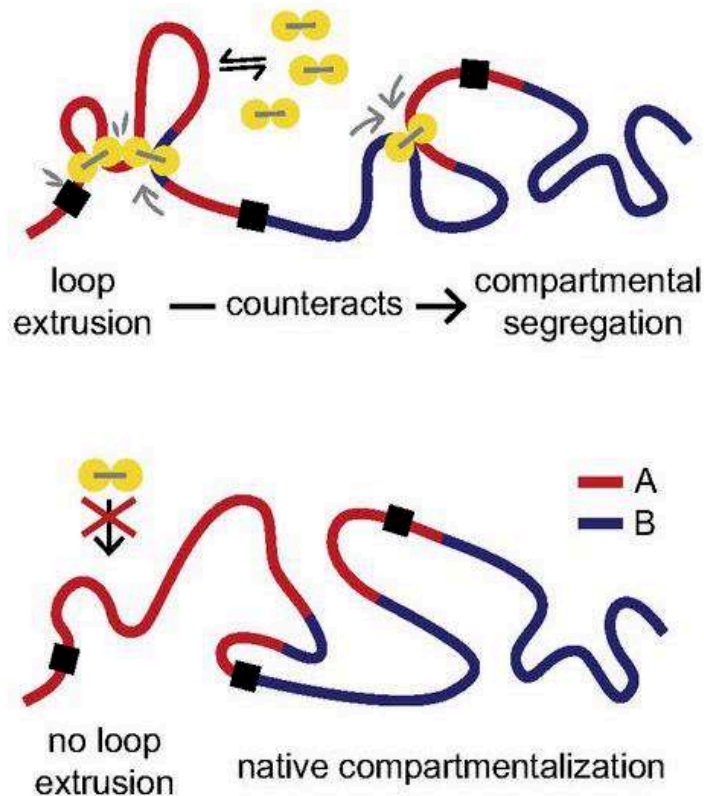


Figure 12 : Modèle de la formation des compartiments par séparation de phase

(a) Schéma représentant le fonctionnement de la séparation de phase. Les liquides composés de protéines aux propriétés physico-chimiques différentes du milieu environnant s'isolent et se regroupent pour former des gouttelettes. (b) Modèle : La formation des TAD par loop extrusion semble s'opposer à la bonne compartimentation de l'ADN, potentiellement par séparation de phase (d'après Nuebler et al., 2018). L'absence de loop extrusion conduirait à une meilleure ségrégation de la chromatine dans les deux compartiments en fonction de sa composition en modifications d'histones.

INTRODUCTION

Néanmoins, le rôle de HP1 dans la séparation de phase exercée dans l'hétérochromatine est encore controversé *in vivo* (Erdel et al., 2020; Strom et al., 2017). Le compartiment B étant principalement composé d'hétérochromatine, il est possible qu'il soit formé grâce à la protéine HP1. Le compartiment B pourrait également être en partie formé grâce au phénomène de séparation de phase exercé par le complexe répresseur de la transcription Polycomb (PRC1) (Plys et al., 2019). Le compartiment A pourrait également être formé grâce aux interactions entre régions qui possèdent des marques chromatiniennes similaires (marques actives des histones) ou grâce à la présence de la RNA Polymérase II (Boehning et al., 2018). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de ce phénomène dans la formation des compartiments A et B. Des simulations ont déjà pu montrer qu'un comportement de séparation de phase pourrait expliquer la compartimentation de la chromatine (Rao et al., 2017).

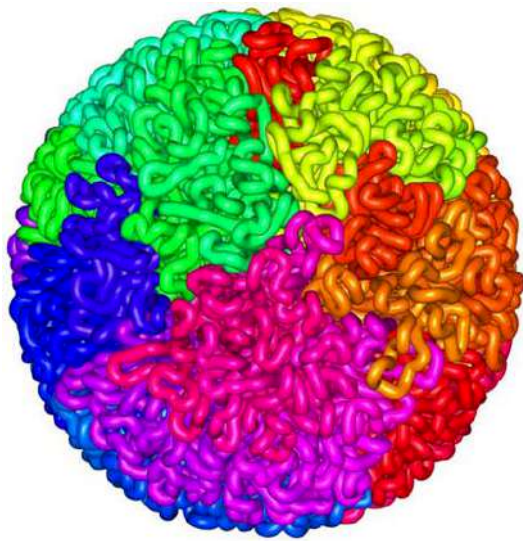
3. Niveaux supérieurs d'organisation de la chromatine dans le noyau

A. Les territoires chromosomiques

Grâce à des techniques de FISH, une technique d'imagerie où chaque chromosome est hybridé à des sondes d'ADN reconnues par une fluorescence différente, il a été montré que les chromosomes en interphase occupaient chacun une région préférentielle du noyau (Szczepińska et al., 2019). Chaque région du noyau ainsi occupée par un chromosome s'appelle un territoire chromosomique (Figure 13). Les territoires chromosomiques sont bien conservés entre plusieurs cellules d'un même tissu mais sont assez hétérogènes d'un tissu à l'autre (Parada et al., 2004).

De plus, les données de Hi-C montrent que les interactions intra-chromosomiques sont nettement favorisées par rapport aux interactions inter-chromosomiques, ce qui valide par une approche différente l'existence des territoires chromosomiques (Lieberman-Aiden et al., 2009). En effet, si un chromosome interagit plus avec lui-même qu'avec les autres, cela démontre que les différents chromosomes ne sont pas aléatoirement mélangés dans le noyau mais qu'ils occupent chacun leur propre région du noyau.

Enfin, la position de chaque chromosome au sein du noyau n'est pas aléatoire puisqu'il a également été montré que les chromosomes riches en gènes actifs ont tendance à se situer vers le centre du noyau. A l'inverse, des chromosomes majoritairement inactifs, qui contiennent beaucoup d'hétérochromatine, sont plutôt retrouvés vers la périphérie nucléaire



Chromosome 1

Chromosome 2

Chromosome 3

Chromosome 4

...

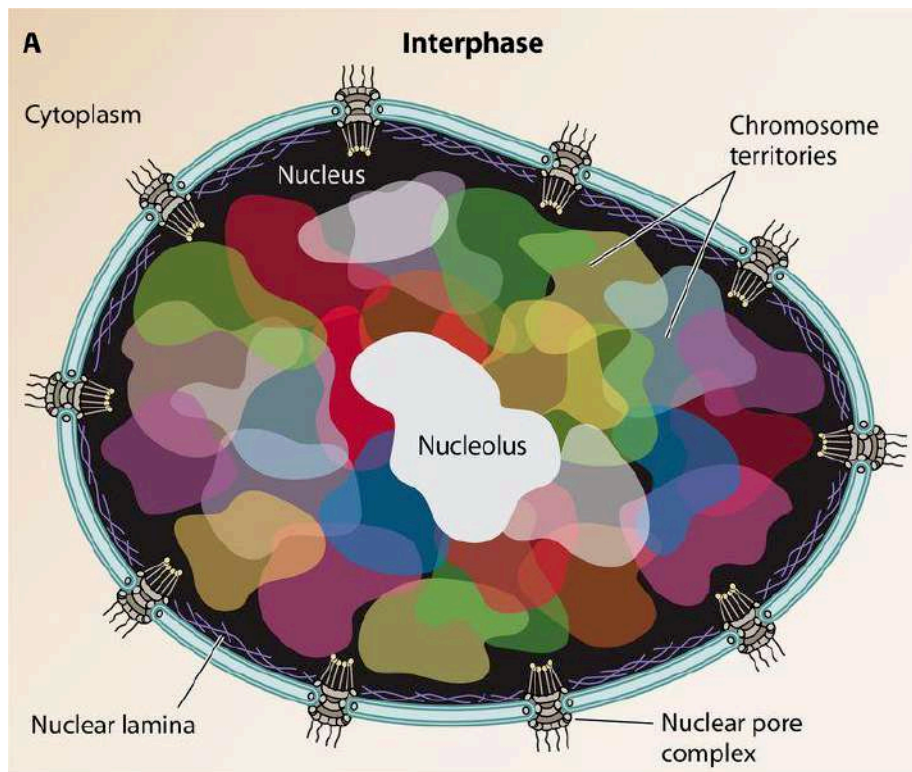


Figure 13 : les territoires chromosomiques.

Représentation des territoires chromosomiques (d'après <http://aidenlab.org> et Fraser et al., 2015). Les chromosomes ne sont pas mélangés dans le noyau. Au contraire, chaque chromosome, coloré ici dans une couleur différente occupe un territoire spécifique du noyau. Cela favorise les interactions intra-chromosomiques.

INTRODUCTION

(Boyle, 2001). Cela pourrait être dû à de la séparation de phase puisqu'il a été montré que l'ARN produit lors de la transcription pouvait créer un compartiment phasique spécifique (Langdon and Gladfelter, 2018). Néanmoins, cette hypothèse mérite d'avantage d'investigations.

B. Les domaines associés aux lamines

Le long de la membrane interne du noyau se trouve un réseau composé par des protéines appelées lamines. Ce réseau permet notamment de structurer le noyau. Il existe des régions génomiques qui interagissent fréquemment avec ce réseau de lamines : les LAD (Lamina-Associated Domains). Les cellules de mammifères possèdent environ 1000-1500 LAD d'une taille médiane de 0,5 Mb (van Steensel and Belmont, 2017). De la même façon que pour les territoires chromosomiques, les LAD sont relativement stables d'une cellule à l'autre. Les LAD sont principalement des régions hétérochromatinisées, pauvres en gènes actifs. En effet, elles sont caractérisées par une activité de répression de la transcription (Yokochi et al., 2009).

Un étude datant de 2015 a par ailleurs montré que les LAD corrélaient fortement avec les régions contenues dans le compartiment B, révélé par Hi-C (Kind et al., 2015). Il existe également une corrélation entre les frontières des LAD et des TAD (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012).

C. Le nucléole

Enfin il existe différentes sous-régions dans le volume nucléaire, non séparées par des membranes. Parmi celles-ci on trouve le nucléole. Le nucléole est connu pour contenir l'ADN ribosomique. L'ADN ribosomique étant réparti sur plusieurs fragments de chromosomes, le nucléole renferme donc des portions des différents chromosomes concernés. Bien que le nucléole possède une très forte activité de transcription de l'ADN ribosomique, c'est également une région riche en hétérochromatine. Par exemple les télomères et les centromères y sont souvent associés (Bersaglieri and Santoro, 2019). Tout comme les LAD, le nucléole est associé au compartiment B détecté par Hi-C. Enfin, de récentes observations suggèrent que la formation du nucléole serait due en partie à de la séparation de phase (Feric et al., 2016).

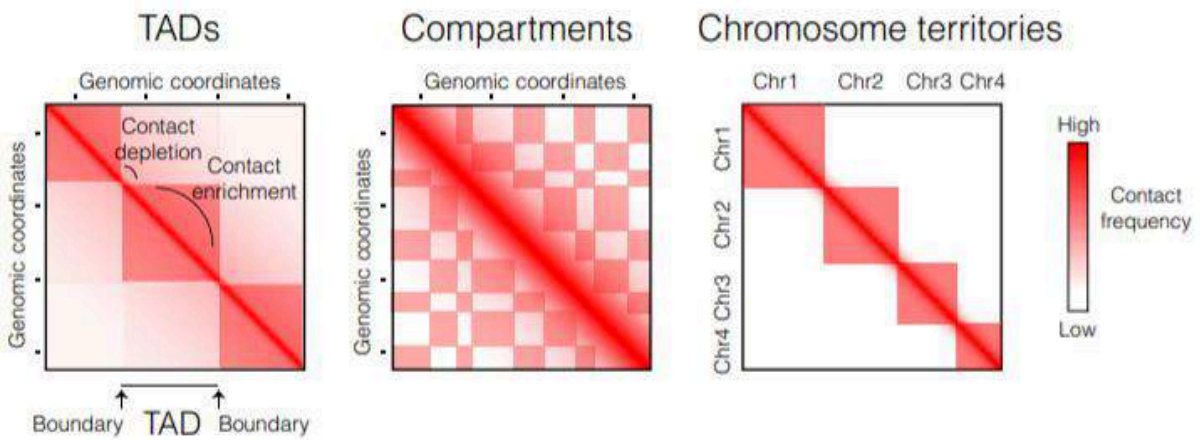
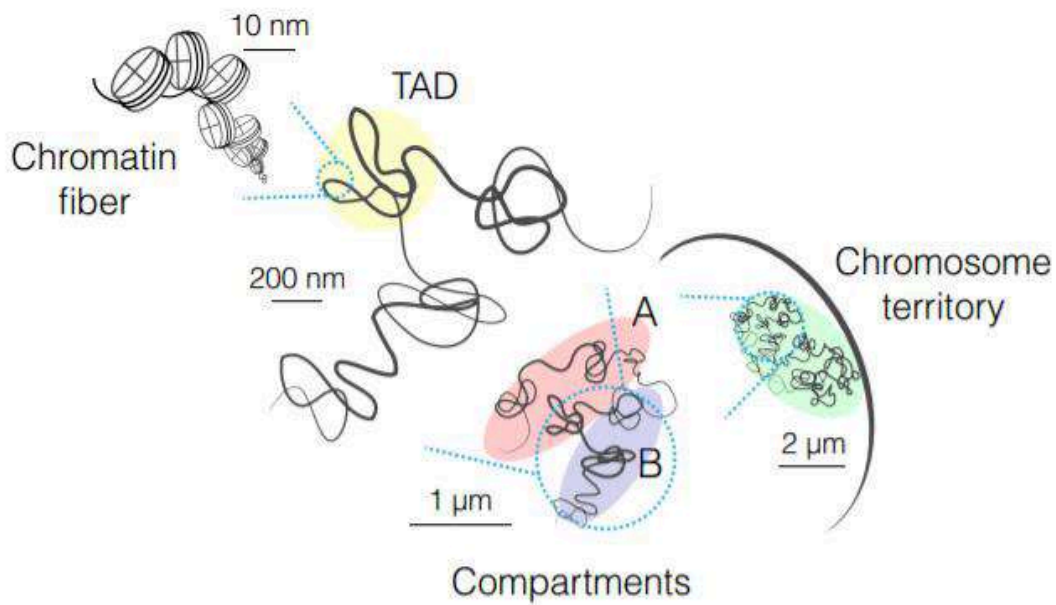


Figure 14 : les territoires chromosomiques.

Schéma récapitulatif des différents niveaux d'organisation tridimensionnelle de la chromatine (d'après Szabo et al., 2019).

INTRODUCTION

L'ensemble de ces observations indique que le génome est organisé à différentes échelles en trois dimensions dans le noyau de façon très contrôlée (Figure 14). Cette organisation de la chromatine possède un rôle important dans les processus liés à l'ADN tels que la transcription et la réplication. Cependant ses rôles dans la réparation de l'ADN, selon ses différents degrés d'organisation, ne sont pas encore bien caractérisés.

II. La réparation des cassures double-brin de l'ADN

L'intégrité du génome est quotidiennement menacée par de nombreux dommages. Parmi ces dommages, les cassures double-brin de l'ADN (DSB pour Double-Strand Breaks) sont considérées comme les plus dangereuses pour les cellules. En effet, si elles sont mal réparées, elles peuvent entraîner la mort cellulaire ou l'apparition de mutations/réarrangements chromosomiques, souvent à l'origine de cancers.

Les DSB peuvent être causées par de nombreux stress environnementaux, tels que les chimiothérapies, les irradiations ou la fumée de cigarette. Les DSB peuvent également survenir de façon programmée par les cellules, par exemple lors de la méiose dans les cellules germinales ou lors de la recombinaison V(D)J et de la commutation isotypique dans les cellules immunitaires, phénomènes permettant de générer un large répertoire d'anticorps. Enfin les DSB peuvent avoir une cause endogène mais non souhaitée. Par exemple, ces dernières apparaissent souvent sur les régions transcrites, qui sont riches en structures secondaires (par exemple les G quadruplexes, les R-loops) pouvant bloquer la fourche de réplication, fragilisant le génome et pouvant conduire à l'apparition de dommages (García-Muse and Aguilera, 2016; Marnef et al., 2017; Puget et al., 2019). D'autre part, les frontières de TAD sont également des régions fragiles, sujettes à l'apparition de DSB endogènes (Canela et al., 2017, 2019; Gothe et al., 2019). En effet, la présence des cohésines et de CTCF aux frontières de TAD pourrait bloquer la résolution des contraintes topologiques effectuée par la Topoisomérase II sur les gènes en cours de transcription, conduisant ainsi à la formation de DSB par la Topoisomérase II.

L'apparition de DSB dans le génome conduit à la mise en place de la DDR (DNA Damage Response), qui comprend la détection, la signalisation puis la réparation des DSB. La réparation des DSB est effectuée chez les mammifères principalement par la jonction des extrémités non homologues (NHEJ) ou par la recombinaison homologue (HR). De façon intéressante, et comme cela sera évoqué tout au long de ce chapitre, la chromatine et ses modifications tiennent une place très importante tout au long de la DDR.

1. Détection et signalisation des DSB

Lorsqu'une cassure double-brin survient dans le génome, celle-ci est très rapidement détectée et fixée par les protéines dites « senseurs », telles que PARP-1 et 2, le complexe MRN (Mre11,

INTRODUCTION

Rad50 et NBS1) et l'hétérodimère KU70-KU80. PARP1-2 favorisent l'accumulation du complexe MRN et des protéines KU sur les sites endommagés (Caron et al., 2019a; Lavin et al., 2015). La reconnaissance des extrémités d'ADN permet par la suite le recrutement de protéines majeures dans la signalisation et la réparation des DSB : ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), DNA-PKcs (sous-unité catalytique de la DNA-Dependent Protein Kinase) et indirectement ATR (Ataxia Telangiectasia Rad3-related) (Blackford and Jackson, 2017). ATM, DNA-PKcs et ATR sont des PI3K-related kinases (Phosphoinositide-3-kinase-related kinases), caractérisées par une activité sérine-thréonine kinase et qui possèdent une grande quantité de cibles de phosphorylation, parmi lesquelles se trouvent des protéines de signalisation ou de réparation des DSB.

ATM est recrutée directement aux DSB grâce à NBS1 du complexe MRN (Lee and Paull, 2005). NBS1 favorise également l'activation d'ATM, c'est-à-dire sa dé-dimérisation et son auto-phosphorylation sur son résidu S1981. DNA-PKcs est recrutée directement grâce aux protéines KU pour former le complexe DNA-PK. ATR, quant à lui, n'est pas spécifique des DSB, mais interagit avec l'ADN simple-brin généré, soit lors d'une étape précoce de la réparation des DSB par HR, qui consiste à générer de l'ADN simple brin (voir partie 2B), soit lors de défauts de la réplication en phase S. Ainsi, ATR, associé à son partenaire ATRIP, peuvent reconnaître l'ADN simple-brin grâce à la protéine RPA, qui recouvre ce-dernier (Cimprich and Cortez, 2008).

A. Arrêt du cycle cellulaire

ATM et ATR provoquent tout d'abord un arrêt du cycle cellulaire pour donner le temps aux cellules de réparer leur ADN, et ainsi empêcher de transmettre les dommages aux cellules filles (Shaltiel et al., 2015). Il existe plusieurs voies menant à l'arrêt du cycle cellulaire, reposant chacune sur l'inhibition des complexes Cdk/Cyclin, complexes indispensables à la transition entre les différentes phases du cycle cellulaires.

Lors de la phase G1 du cycle cellulaire, deux mécanismes peuvent conduire à l'arrêt de ce cycle. Pour cela, ATM peut activer la protéine CHK2, qui permet la phosphorylation et donc la stabilisation de la protéine p53. p53 contribue alors à l'activation de la transcription du gène p21 qui va alors inhiber les complexes Cdk2/Cyclin E et Cdk4,6/Cyclin D, empêchant ainsi l'entrée en phase S (Pietenpol and Stewart, 2002). D'autre part, CHK1 et CHK2, phosphorylés respectivement par ATR et ATM, phosphorylent à leur tour Cdc25a, ceci favorisant son

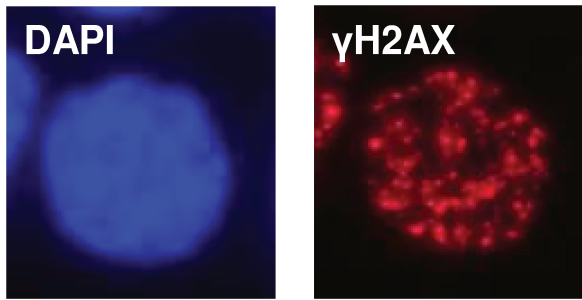
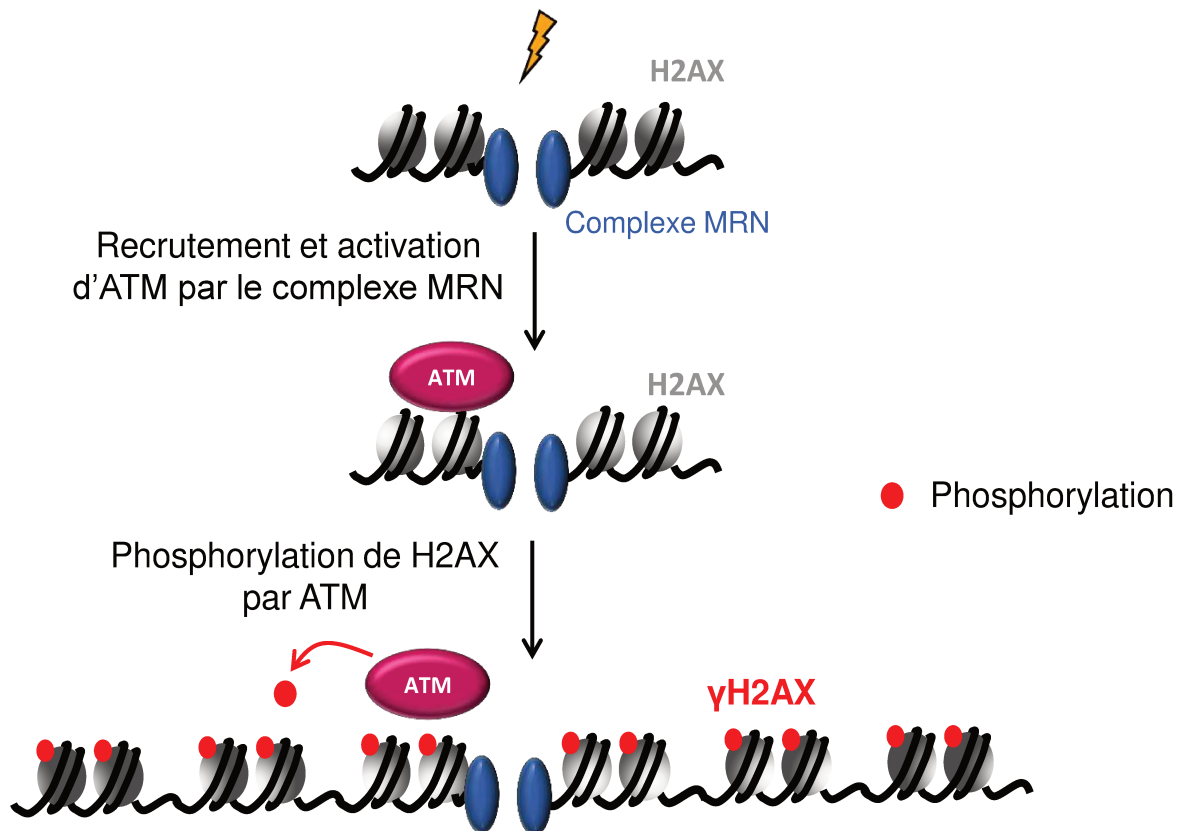
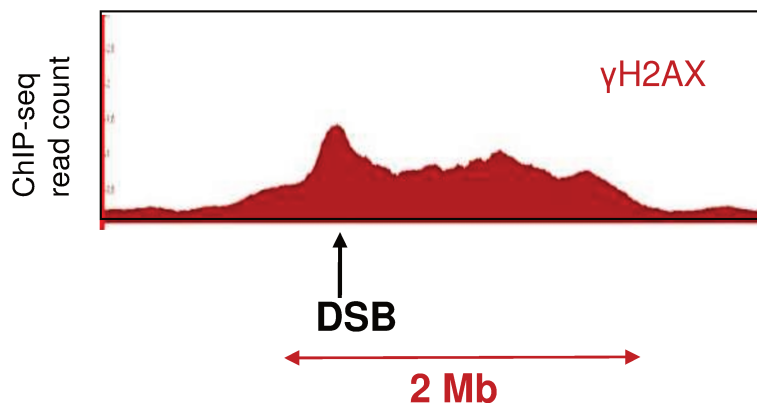
a**b****c**

Figure 15 : γ H2AX à l'origine des foyers de réparation.

(a) Marquage de γ H2AX (marqueur des DSB) en immunofluorescence après induction de DSB (avec l'enzyme de restriction AsiSI) dans des U2OS. Cette marque d'histone impliquée dans la réparation forme de larges foyers de réparation autour des DSB. (b) Le complexe MRN détecte la présence d'une DSB. Il recrute et active la PI3K-related kinase ATM. ATM phosphoryle H2AX pour former γ H2AX sur un large domaine d'1-2 Mb. (c) Exemple du profil de γ H2AX autour d'une DSB en ChIP-seq dans des U2OS (d'après Caron et al., 2015). Le profil de γ H2AX autour de la DSB s'étend jusqu'à 1,5Mb de la DSB et ce, d'une façon qui peut être très asymétrique de part et d'autre de la DSB.

INTRODUCTION

ubiquitylation et donc sa dégradation. La dégradation de Cdc25a, qui est une protéine activatrice du complexe Cdk2/Cyclin E, conduit alors à l'inhibition de ce complexe et donc également à l'arrêt du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S (Deckbar et al., 2011; Warmerdam and Kanaar, 2010).

Enfin en phase G2, ATM et ATR peuvent phosphoryler respectivement CHK2 et CHK1, qui à leurs tours phosphorylent Cdc25c, conduisant à son export hors du noyau et à sa séquestration dans le cytoplasme. Cela conduit à l'inhibition du complexe Cdk1/Cyclin B et donc au blocage de l'entrée en phase M. En parallèle, CHK1 et CHK2 stabilisent p53, qui active la transcription de p21, qui participe également à l'inhibition du complexe Cdk1/Cyclin B, provoquant aussi l'arrêt en G2/M (Deckbar et al., 2011; Warmerdam and Kanaar, 2010).

Il est à noter que si le génome est trop endommagé et/ou si les cassures ne parviennent pas à être réparées, cet arrêt du cycle cellulaire peut se poursuivre jusqu'à la mort de la cellule.

B. Les foyers de réparation

Suite à l'apparition de cassures double-brin dans le génome, les PI3K-related kinases vont, en plus de bloquer la progression du cycle cellulaire, permettre d'initier la signalisation nucléaire indiquant la présence de DSB afin de recruter des protéines de réparation. En effet, elles permettent la formation de « foyers de réparation » autour des DSB (Bekker-Jensen and Mailand, 2010). Ces foyers de réparation sont très volumineux et sont donc visibles en cytologie grâce à un immuno-marquage de(s) protéine(s) qui les composent. Ces foyers de réparation, appelés initialement IRIF (pour IR (irradiations) Induced Foci) sont notamment caractérisés par la présence de protéines de la réparation telles que 53BP1 et MDC1, mais également de marques chromatiniennes, telles que γ H2AX et l'ubiquitylation de la chromatine (Figure 15a).

B1. γ H2AX

- Etablissement de γ H2AX

Un des premiers événements de signalisation qui a lieu suite à l'apparition d'une DSB dans le génome est la phosphorylation du variant d'histone H2AX sur sa sérine 139 chez les mammifères, qui une fois phosphorylé s'appelle γ H2AX (Rogakou et al., 1998). En effet,

INTRODUCTION

γ H2AX est détectable seulement quelques secondes après l'induction de DSB par irradiations, ce qui explique qu'il soit le marqueur des DSB le plus communément utilisé (Georgoulis et al., 2017). De façon intéressante, il a été observé une stabilisation de H2AX médiée par une inhibition de sa dégradation, ainsi qu'une augmentation de sa déposition dans la chromatine aux sites de dommages, ceci pouvant permettre de potentialiser le rôle de γ H2AX dans la réparation (Atsumi et al., 2015; Piquet et al., 2018).

En fonction du contexte, H2AX peut être phosphorylé par les PI3kinases-related kinases ATM, DNA-PK ou ATR. Par exemple, dans le cas de DSB induites par irradiations, il n'est pas clair si une ou plusieurs kinases sont impliquées dans la phosphorylation d'H2AX puisqu'il a été montré dans une étude que la phosphorylation d'H2AX dépend d'ATM, et dans une autre étude qu'elle dépend principalement de DNA-PK (An et al., 2010; Burma et al., 2001). Réconciliant ces deux études, il semble que DNA-PK et ATM peuvent avoir un rôle redondant sur la phosphorylation d'H2AX après irradiations puisque leur double inhibition est nécessaire pour abolir γ H2AX (Stiff et al., 2004). Au contraire, dans un contexte où les DSB sont « propres », c'est-à-dire avec des extrémités non modifiées, donc par exemple induites par une enzyme de restriction, H2AX est phosphorylé majoritairement par ATM (Caron et al., 2015). Enfin, en phase S, lorsque des DSB sont induites par des stress réplicatifs, H2AX est préférentiellement phosphorylé par ATR (Ward and Chen, 2001). Chez la levure, H2AX est phosphorylé par les homologues d'ATM et d'ATR (respectivement Tel1 et Mec1) et l'inhibition de ces deux kinases est nécessaire pour abolir complètement γ H2AX (Li et al., 2019; Shroff et al., 2004).

- Propagation de γ H2AX

De façon surprenante, γ H2AX est phosphorylé sur un très large domaine en 15-30 minutes, qui peut atteindre 1 ou 2 Mb autour de chaque DSB (Figure 15b) (Iacovoni et al., 2010; Rogakou et al., 1998; Savic et al., 2009). Bien que DNA-PK et ATM aient été impliquées dans la phosphorylation d'H2AX en interphase, seule ATM est responsable de la phosphorylation de H2AX à distance des DSB (Caron et al., 2015; Savic et al., 2009). Cette phase de propagation de γ H2AX à grande distance de la DSB correspond à une phase d'amplification du signal et est un phénomène conservé puisqu'il a également été observé par ChIP chez la levure sur un domaine de 50kb autour d'une DSB (Shroff et al., 2004). Enfin, sa propagation autour de la DSB peut être hautement asymétrique et non régulière, c'est-à-dire avec des pics et des creux (voir chapitre III) (Iacovoni et al., 2010). La façon dont γ H2AX se propage ainsi aussi loin de la DSB de façon ATM-dépendante est à ce jour mal comprise.

INTRODUCTION

- Fonction de γ H2AX

De façon intéressante, des souris knock out pour le gène H2AX sont viables mais montrent des signes importants d'un défaut de réparation de l'ADN, tels qu'une hypersensibilité aux irradiations, une stérilité des mâles et une immunodéficience (Celeste et al., 2002). De plus, des cellules ES KO pour H2AX présentent une augmentation des aberrations chromosomiques, telles que des translocations, que ce soit de façon spontanée ou suite à des irradiations (Bassing et al., 2002). Enfin, l'utilisation de lignées rapportrices indiquent que γ H2AX inhibe la voie de réparation SSA (Single-Strand-Annealing), voie de réparation très mutagène, et favorise la réparation par HR (Recombinaison Homologue), voie de réparation connue comme étant très fidèle (Sonoda et al., 2007; Xie et al., 2004).

D'autre part, γ H2AX n'est pas indispensable pour le recrutement initial des protéines de la réparation mais possède en revanche un rôle dans l'accumulation et la rétention de ces protéines à la DSB sous forme de foyer (Celeste et al., 2003). L'ensemble de ces données indiquent que γ H2AX ne semble pas indispensable à la réparation des DSB mais qu'il permettrait plutôt de potentialiser la fidélité de la réparation. En accord avec cette hypothèse, il a été montré qu'ATM, la kinase qui promeut la phosphorylation d'H2AX à distance de la DSB, n'est pas indispensable à la réparation mais favorise sa fidélité (Bennardo and Stark, 2010; Bhargava et al., 2017; Caron et al., 2015).

En plus de la phosphorylation de H2AX aux sites de dommages, le fait que γ H2AX soit propagé aussi loin de la DSB et que ce phénomène soit conservé suggèrent un rôle important de cette propagation dans la réparation. Bien que le rôle de cette propagation soit encore mal compris, il existe plusieurs hypothèses. Cette propagation de γ H2AX dans la réparation pourrait être impliquée dans le recrutement sur un large domaine de protéines effectrices, importantes pour la réparation, telles que MDC1 ou 53BP1. Enfin, la formation de ces grands domaines de chromatine modifiée pourrait directement modifier les propriétés de la chromatine endommagée (par exemple sa compaction ou sa mobilité au sein du noyau, voir partie III).

B2. MDC1

γ H2AX est directement reconnu et fixé par la protéine MDC1, qui va ainsi pouvoir être phosphorylée par ATM (Stucki et al., 2005). MDC1 permet d'amplifier la signalisation en favorisant la stabilisation d'ATM aux DSB, potentialisant ainsi la phosphorylation de H2AX par ATM (Lou et al., 2006; Savic et al., 2009). Une autre fonction de MDC1 est d'agir comme

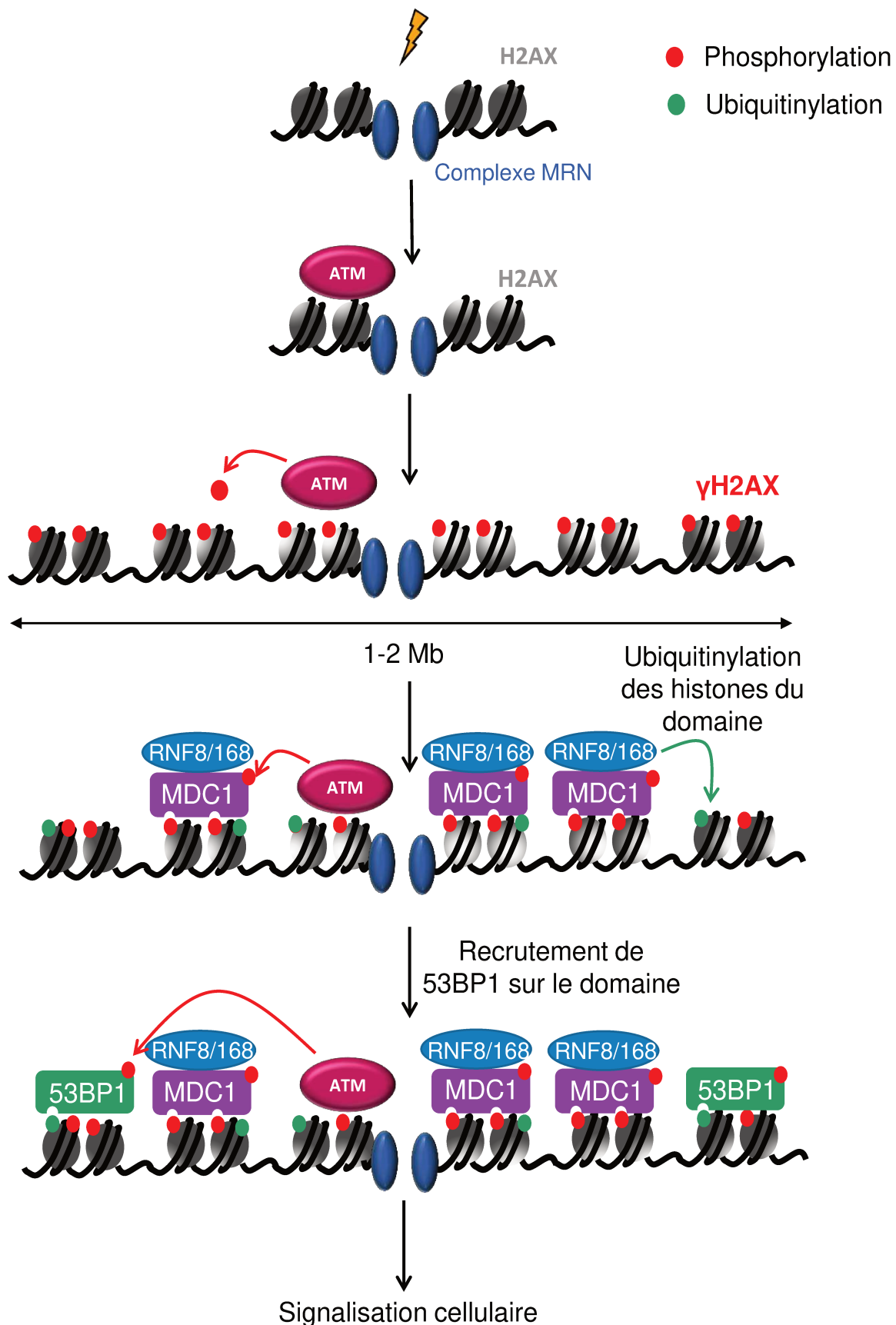


Figure 16 : Les foyers de réparation.

Le large domaine de γ H2AX, phosphorylé par ATM est reconnu par la protéine MDC1, qui est à son tour phosphorylée par ATM. MDC1 recrute les ubiquitine ligases RNF8 et RNF168 qui ubiquitinylent la chromatine sur l'ensemble du domaine γ H2AX. Ces marques d'ubiquitylation (associées à des marques préexistantes) sont reconnues et fixées par la protéine de réparation 53BP1. Cette cascade d'évènements permet la signalisation de la présence d'une DSB à l'échelle du mégadomaine.

INTRODUCTION

intermédiaire entre γ H2AX et d'autres protéines en recrutant par exemple l'ubiquitine ligase RNF8 grâce à une interaction directe de ces deux protéines (Huen et al., 2007; Mailand et al., 2007). Une fois recrutée aux DSB, RNF8 peut ubiquitinyler l'histone H1 (Mailand et al., 2007; Thorslund et al., 2015). Cette marque d'histone peut ensuite être reconnue par une autre ubiquitine ligase : RNF168, qui quant à elle, peut ubiquitinyler les histones H2A et H2AX sur leur lysine 13 et 15 pour former H2A(X)K13-15ub (Doil et al., 2009; Mattioli et al., 2012). L'ubiquitinylation de la chromatine se retrouve alors présente, via MDC1 puis RNF8 et RNF168, sur l'ensemble du domaine γ H2AX (Clouaire et al., 2018) et permet alors de transmettre le signal de détresse de la DSB sur un grand domaine (Figure 16).

B3. 53BP1

53BP1 (p53-binding protein 1) est également une cible de phosphorylation de la kinase ATM (Rappold et al., 2001). Cette protéine est recrutée au niveau de la chromatine ubiquitinylée par RNF168 (H2A(X)K15Ub), et reconnaît également les nucléosomes contenant initialement H4K20me2 (Panier and Boulton, 2014), qui sont spécifiquement accessibles autour des DSB. 53BP1 est ainsi recrutée sur l'ensemble du foyer de réparation couvert par γ H2AX (Fradet-Turcotte et al., 2013; Clouaire et al., 2018; Mallette et al., 2012). 53BP1 possède un rôle majeur dans la réparation des DSB. D'une part, 53BP1 est un élément déterminant dans le choix de la voie de réparation des DSB (voir partie « Choix de la voie de réparation »). 53BP1 est également un acteur essentiel de l'arrêt du cycle cellulaire suite à l'apparition de dommages dans le génome (Fernandez-Capetillo et al., 2002; Wang et al., 2002). En effet, il est nécessaire à l'accumulation de p53 et au maintien de l'activation des checkpoints (Cuella-Martin et al., 2016; Shibata et al., 2010). Enfin, 53BP1 possède des propriétés de séparation de phase et le fait que 53BP1 se propage sur un si grand domaine grâce à γ H2AX pourrait être important pour cette fonction de 53BP1 (voir chapitre III) (Kilic et al., 2019).

2. Les mécanismes de réparation des DSB

Suite à la détection et à la signalisation des DSB survenues dans le génome, des mécanismes de réparation sont mobilisés afin de restaurer la séquence de la molécule d'ADN. Il existe deux mécanismes principaux de réparation des DSB : La Jonction d'Extrémités Non Homologues (NHEJ) et la Recombinaison Homologue (HR).

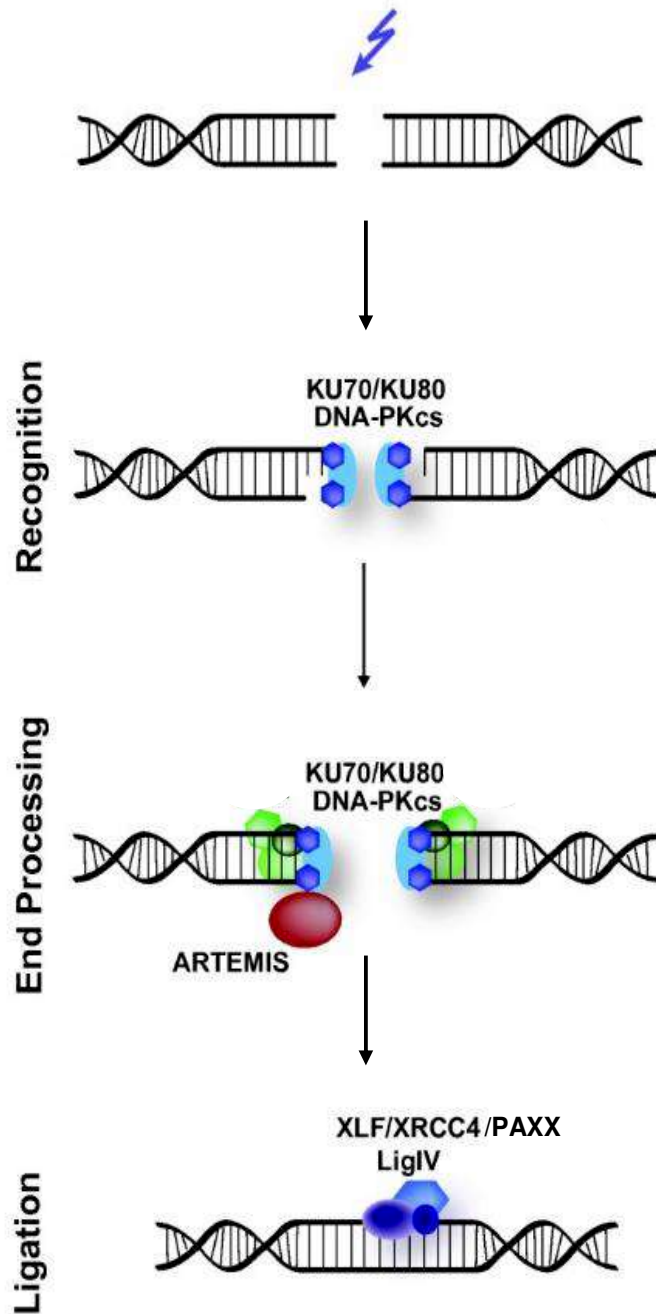


Figure 17 : La réparation par Jonction des Extrémités Non Homologues (NHEJ).

Les senseurs Ku70-Ku80 ayant reconnu la DSB, vont recruter et déclencher l'auto-phosphorylation de la PI3K-related kinase DNA-PKcs pour former le complexe DNA-PK. DNA-PK permet de phosphoryler les différents acteurs de la NHEJ et de garder les extrémités d'ADN proches l'une de l'autre. Les extrémités sont éventuellement maturées (par la nucléase Artemis par exemple) afin d'être compatibles. DNA-PK conduit également au recrutement du complexe XRCC4-LigaseIV ainsi que de protéines « scaffold » telles que PAXX et XLF. La LigaseIV permet la ligation des deux extrémités d'ADN ensemble (d'après Iliakis et al., 2015).

A. La Jonction d'Extrémités Non Homologues

La NHEJ est le mécanisme de réparation prépondérant dans les cellules humaines et consiste simplement en la religation des deux extrémités d'ADN formées par la DSB (Figure 17). La NHEJ peut avoir lieu durant les phases G₁, S et G₂ du cycle cellulaire. Pour cela, comme mentionné précédemment, les senseurs Ku70-Ku80 ayant reconnu la DSB, recrutent et déclenchent l'auto-phosphorylation de la PI3K-related kinase DNA-PKcs pour former le complexe DNA-PK. DNA-PK permet de phosphoryler les différents acteurs de la NHEJ et de garder les extrémités d'ADN proches l'une de l'autre (DeFazio et al., 2002; Soutoglou et al., 2007). DNA-PK conduit également au recrutement du complexe XRCC4-LigaseIV et de protéines « scaffold » telles que PAXX et XLF, qui permettent de religuer les deux extrémités d'ADN ensemble (Burma et al., 2006). XRCC4, phosphorylé par DNA-PK, promeut la stabilité de la LigaseIV à la DSB et potentialise son action de ligation (Bryans et al., 1999).

Selon la source d'induction des DSB, les extrémités d'ADN générées peuvent être franches ou « propres », et dans ce cas la ligation des extrémités peut être directement effectuée pour restaurer fidèlement la séquence d'ADN. Cependant les extrémités peuvent parfois être non compatibles, comme par exemple après l'induction de DSB par irradiations. On parle alors de DSB complexes car elles peuvent contenir par exemple des adduits, des extrémités 3' phosphorylées, des extrémités 5' déphosphorylées ou encore des pontages inter-brins. Dans ce cas, une maturation des extrémités sera nécessaire avant de procéder à leur ligation et à la réparation. Par exemple, la nucléase Artemis peut digérer les extrémités d'ADN afin de les rendre compatibles (Chang et al., 2017). Des ADN polymérases et des kinases peuvent également participer à la modification des extrémités d'ADN, par exemple pour synthétiser des nucléotides afin de combler les séquences manquantes, puis de les phosphoryler pour qu'elles puissent être liguées ensemble (Scully et al., 2019). De façon importante, ce type de DSB peut conduire à une restauration infidèle de la séquence d'ADN et donc à l'apparition de mutations. Lorsque plusieurs DSB apparaissent dans le génome, la NHEJ est également impliquée dans la formation de translocations, qui sont des échanges de matériel génétique entre deux chromosomes et sont à l'origine de nombreux cancers (Ghezraoui et al., 2014).

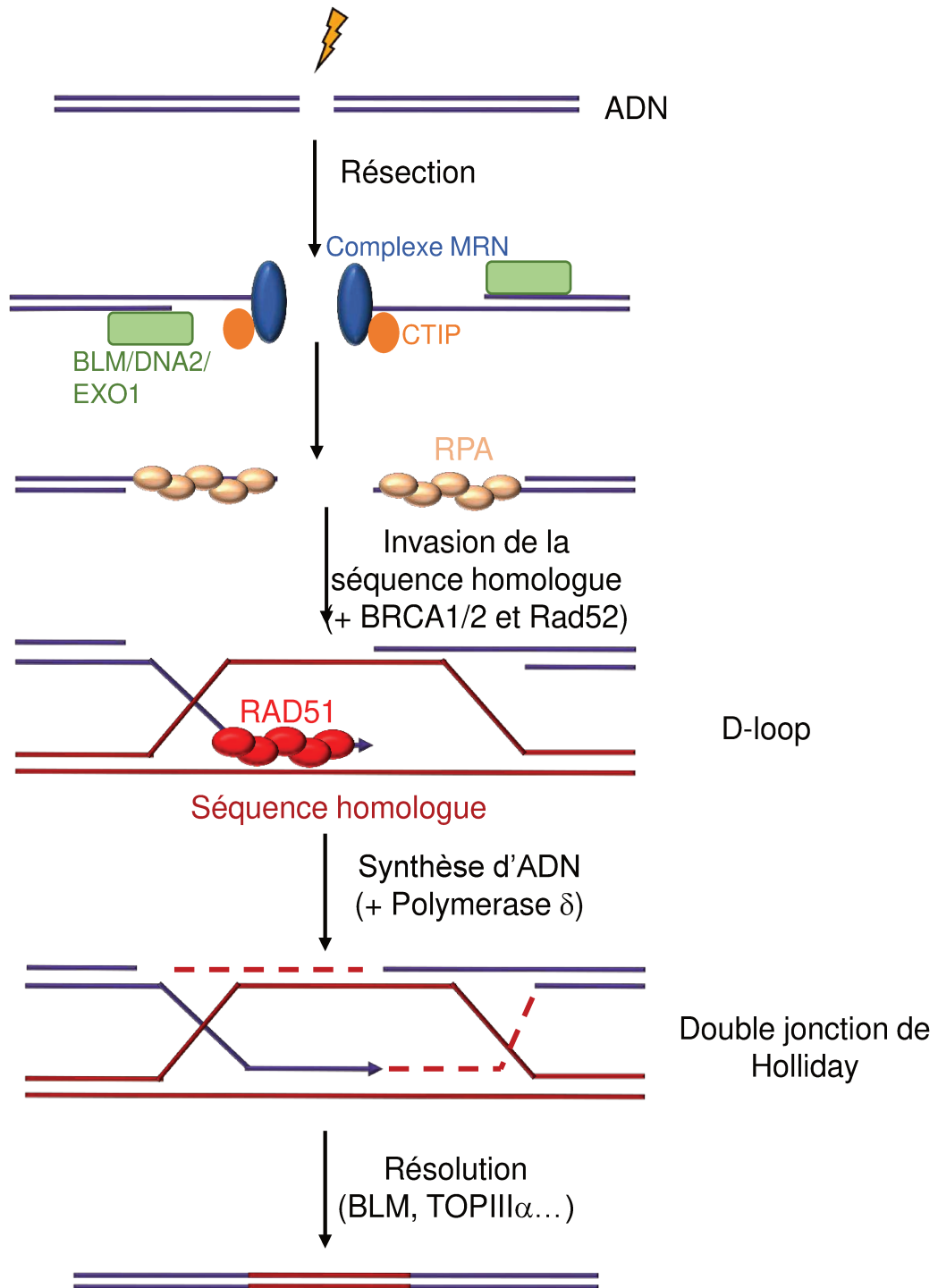


Figure 18 : La réparation par Recombinaison Homologue (HR).

La première étape de la HR est la résection. Puis l'ADN simple-brin 3' sortant généré est recouvert par RPA. RPA est ensuite remplacé par RAD51 grâce à BRCA1, BRCA2 et Rad52 formant un filament nucléoprotéique qui va envahir la séquence d'ADN double-brin homologue (généralement la chromatide sœur), formant une D-loop. La synthèse sur les 2 brins d'ADN par la polymérase δ est ensuite réalisée, formant une Double jonction de Holliday. La résolution de cette structure peut ensuite provoquer des réarrangements de type crossing over (ou non).

B. La recombinaison Homologue

La HR n'a lieu que lors des phases S et G2 du cycle cellulaire et requiert une séquence homologue (généralement sur la chromatide sœur) pour permettre la réparation de l'ADN (Figure 18). La HR est initiée par une étape de résection qui génère de l'ADN simple-brin (Scully et al., 2019). Cette résection est initiée par le complexe senseur MRN. En effet, l'endonucléase Mre11 du complexe MRN peut cliver un brin d'ADN à distance de la DSB et génère, grâce à son activité 3'-5' exonucléase, des extrémités d'ADN 3' sortantes. Cette activité est potentialisée par la protéine CtIP (Sartori et al., 2007). La résection est ensuite étendue grâce aux protéines BLM-DNA2 et Exo1 (Nimonkar et al., 2011).

Une fois les extrémités simple-brin générées, celles-ci sont recouvertes par la protéine RPA pour empêcher la formation de structures secondaires d'ADN. Puis BRCA1, BRCA2 et RAD52 favorisent le remplacement de RPA par la protéine Rad51, formant ainsi un filament nucléoprotéique. A l'aide de BRCA1, ce filament va chercher puis envahir l'ADN double-brin de la séquence homologue (sur la chromatide sœur généralement), formant une structure appelée D-loop. L'autre brin d'ADN 3' sortant correspondant à l'autre extrémité d'ADN peut également s'hybrider à la séquence d'ADN homologue présente sur la D-loop, formant ainsi une structure appelée double jonction de Holliday. La polymérase Pol δ procède ensuite à la synthèse d'ADN en utilisant comme matrice la séquence d'ADN homologue intacte (Scully et al., 2019).

Lorsque l'ADN a été totalement resynthétisé puis reliqué, la double jonction de Holliday doit être dissoute. Pour cela il existe divers mécanismes impliquant un échange de matériel génétique entre les deux séquences homologues (Crossing Over) ou non (Non Crossing Over). La résolution de la double jonction de Holliday conduisant à un Crossing Over repose sur l'utilisation de nucléases telles que MUS81-EME1 (Boddy et al., 2001). Cependant, probablement afin d'éviter un échange de matériel génétique, dans la majorité des cellules humaines elles seront résolues grâce à l'hélicases BLM et à la topoisomérase TOPIII α (Raynard et al., 2006).

La recombinaison homologue est considérée comme un mécanisme de réparation très fidèle. Cependant, si elle utilise le chromosome homologue comme matrice de synthèse, elle peut conduire à une perte d'hétérozygotie. D'autre part, si elle a lieu dans une région répétée elle peut conduire à de larges délétions/amplifications d'ADN ou à des translocations.

C. Choix de la voie de réparation

La NHEJ et la HR sont ainsi deux mécanismes de réparation très différents et n'impliquant pas les mêmes acteurs. La question se pose alors de quel mécanisme est préférentiellement utilisé pour réparer les DSB et dans quelles conditions ?

C1. Le cycle cellulaire : pour ou contre la résection

Comme mentionné précédemment, le cycle cellulaire joue un rôle très important dans le choix de la voie de réparation utilisée (Hustedt and Durocher, 2017). En effet, tandis que la NHEJ peut intervenir tout au long du cycle cellulaire, la HR n'a lieu que durant les phases S et G2 du cycle cellulaire, lorsque la chromatide sœur est synthétisée. Afin de limiter la HR aux phases S et G2, différents mécanismes existent et reposent sur l'inhibition de la résection, qui est une étape critique dans l'engagement dans une des deux voies de réparation. Par exemple, des protéines impliquées dans l'étape de résection sont dégradées spécifiquement en G1, telles que CtIP. Au contraire la phosphorylation de CtIP en S et G2 par des CDK permet son activation spécifiquement dans ces phases du cycle (Jimeno et al., 2019).

D'autre part, la protéine 53BP1 est une protéine majeure dans l'inhibition de la résection en G1 et donc dans la promotion de la NHEJ (Zimmermann and Lange, 2014). 53BP1 agit via des effecteurs tels que REV7, RIF1 et des protéines découvertes plus récemment : les Shieldin (Dev et al., 2018; Ghezraoui et al., 2018; Gupta et al., 2018; Mirman et al., 2018; Noordermeer et al., 2018; Zimmermann et al., 2013). Ces-dernières ont pour fonction de protéger les extrémités d'ADN des nucléases et donc de la résection. Il a également été proposé que les Shieldin pourraient permettre, via le recrutement de la Pol α , de recombler les extrémités simple-brin d'ADN pour palier l'extension de la résection (Mirman et al., 2018) et ainsi de promouvoir la NHEJ.

Le rôle d'inhibition de la résection de 53BP1 et de ses effecteurs pourrait être plus important en G1 qu'en S/G2. En effet, la marque d'histone H4K20me2, reconnue par 53BP1 aux DSB, n'est pas présente en quantité homogène durant le cycle cellulaire. Lors de la réplication, la marque d'histone H4K20me2 se répartie sur les deux chromatides sœurs, on parle alors de dilution de H4K20me2 sur l'ADN. Cette diminution de la quantité de cette marque en S/G2 explique la fixation plus importante de 53BP1 à la chromatine endommagée en G1 qu'en S/G2 (Clouaire et al., 2018; Pellegrino et al., 2017; Simonetta et al., 2018). Cela permet de lever l'inhibition de la résection exercée par 53BP1 en S/G2 et d'autoriser la mise en place de la

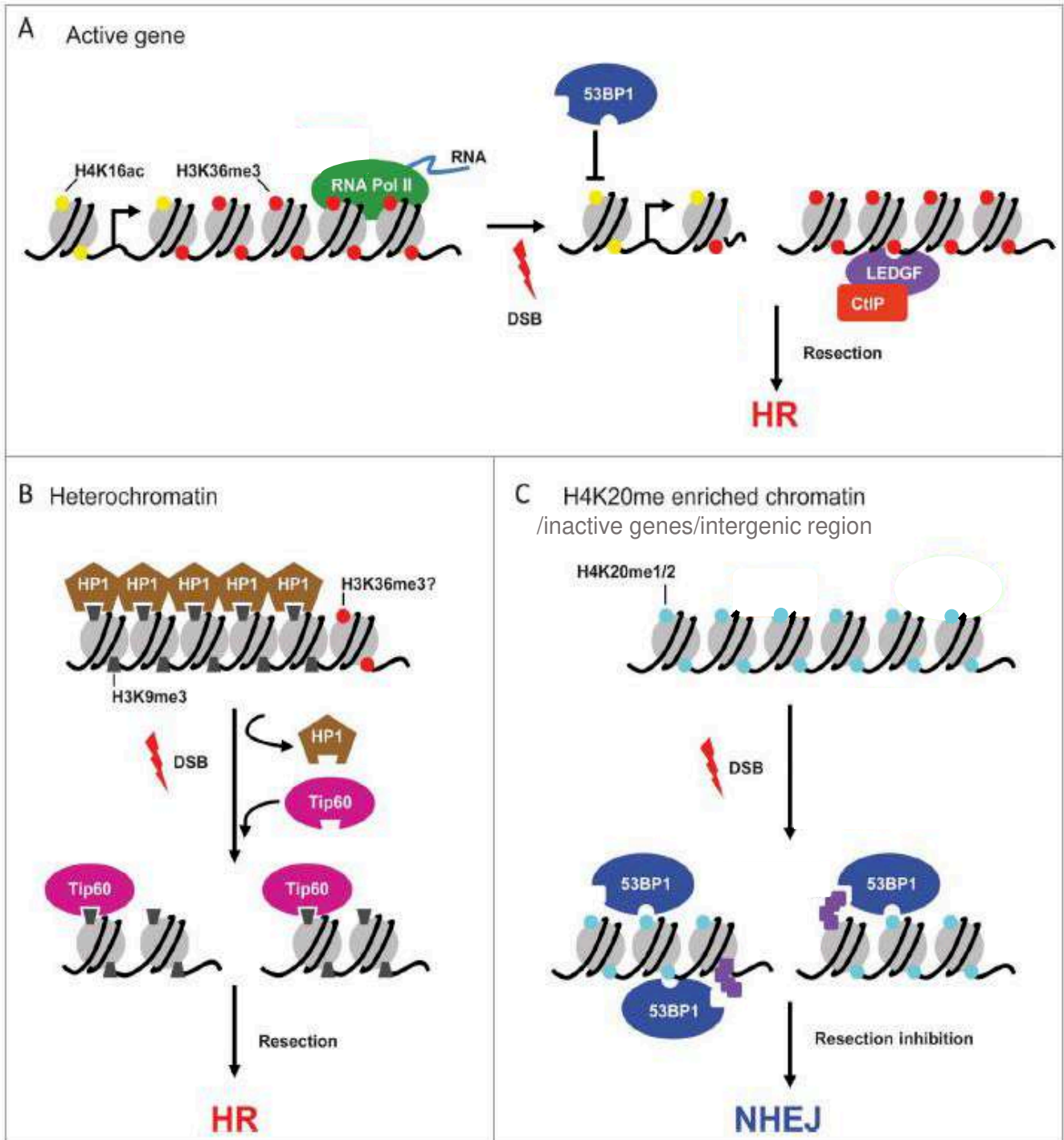


Figure 19 : Rôle de la chromatine préexistante dans le choix de la voie de réparation.

Les marques d'histones présentes sur les gènes actifs et sur l'hétérochromatine favorisent la HR en S/G2 (A,B). L'absence de ces marques et/ou la présence de H4K20me1/2 sur les gènes inactifs ou les régions intergéniques conduisent à la NHEJ (C) (d'après Clouaire and Legube, 2015).

INTRODUCTION

HR. En parallèle, la dilution de cette marque favorise en plus spécifiquement la HR en S/G2. En effet, BRCA1 a la capacité de reconnaître l'histone H4K20me0, ce qui favorise la mise en place de la HR en S et G2 (Nakamura et al., 2019).

En conclusion, il existe une balance entre des protéines favorisant la résection et des protéines inhibant la résection. Ces protéines ou leur association avec la chromatine sont régulées différemment au cours du cycle cellulaire, ce qui permet d'engager la recombinaison homologue en S/G2 ou au contraire, de procéder par défaut à une réparation par NHEJ en G1.

C2. Le contexte chromatinien

Durant les phases du cycle cellulaire S et G2, la HR et la NHEJ peuvent toutes deux être utilisées et le choix entre les deux repose sur d'autres critères que le cycle cellulaire.

Un acteur clef dans le choix de la voie de réparation est le contexte chromatinien préexistant (Figure 19). En effet, il a été montré que des cassures double-brin qui surviennent dans un contexte chromatinien plutôt initialement ouvert et transcriptionnellement actif sont préférentiellement réparées par HR. Cela est dû à la présence de la marque d'histone H3K36me3, principalement présente au niveau des régions transcrites, et qui permet le recrutement de CtIP via la protéine LEDGF. Cela favorise ensuite le recrutement de Rad51 et l'initiation de la HR (Aymard et al., 2014; Clouaire and Legube, 2015; Pfister et al., 2014). En parallèle, l'acétylation pré-existante de H4K16 par TIP60 sur les gènes actifs empêche la fixation de 53BP1 sur H4K20me2, ce qui inhibe son recrutement aux DSB et favorise la résection et donc la HR (Tang et al., 2013). A l'inverse, des régions de l'euchromatine intergéniques ou possédant des gènes inactifs sont réparées par NHEJ (Aymard et al., 2014; Clouaire et al., 2018).

Néanmoins, l'hétérochromatine, dont la transcription est largement inhibée, est également réparée préférentiellement par HR en S/G2 (Beucher et al., 2009; Fortuny and Polo, 2018). Cela est dû en partie à la protéine hétérochromatinienne HP1, qui recrute BRCA1 pour promouvoir la HR (Lee et al., 2013). En parallèle, la marque d'histone fortement présente dans l'hétérochromatine H3K9me3 favorise également la HR en recrutant l'acétyltransférase Tip60, nécessaire à la décompaction de la chromatine et à l'initiation de la HR (Ayrapetov et al., 2014).

3. Réparation des DSB couplée à la transcription

De plus en plus d'observations démontrent que les DSB survenant dans des régions d'ADN riches en gènes actifs vont être prises en charge de façon particulière. Puisque beaucoup de DSB endogènes surviennent dans les gènes (Marnef et al., 2017), il est en effet très important de réparer fidèlement ces cassures car si des mutations apparaissent dans des gènes, cela pourrait être très délétère.

A. Mécanismes de réparation spécifiques

Les mécanismes de réparation de DSB qui surviennent dans des gènes actifs sont spécifiques puisqu'ils doivent faire face à la présence de la machinerie de transcription ainsi qu'aux structures secondaires liées au processus de transcription en cours, comme les hybrides ADN-ARN. D'ailleurs, ces hybrides ADN-ARN s'accumulent suite à l'apparition de DSB. Ces structures doivent alors être enlevées pour permettre le recrutement de Rad51 et pour pouvoir ainsi poursuivre une réparation fidèle (Cohen et al., 2018).

Comme mentionné précédemment, grâce à des modifications de la chromatine préexistantes, les DSB survenant dans des gènes actifs recrutent la protéine Rad51 et sont préférentiellement réparées par HR en S/G2, un mécanisme connu comme étant très fidèle. La question se pose alors de ce qu'il advient des DSB qui surviennent dans les gènes en phase G1 du cycle cellulaire, lorsque la HR est inhibée. De façon intéressante, lorsque des DSB surviennent dans des gènes durant la phase G1, ces DSB deviennent persistantes (Aymard et al., 2017) (voir chapitre III et Discussion).

B. Inhibition de la transcription

Une des conséquences de l'apparition de DSB dans un gène actif est l'extinction de la transcription au site de dommage. La machinerie de transcription, et notamment la RNA PolII, pourraient gêner le processus de réparation. En effet, lorsque l'inhibition de la transcription n'est pas réalisée, une diminution du recrutement de protéines de la réparation et de larges réarrangements chromosomiques sont observés, signes d'une mauvaise réparation (Gong et al., 2017; Meisenberg et al., 2019).

INTRODUCTION

Bien que les mécanismes d'inhibition de la transcription en réponse aux DSB ne soient pas encore totalement caractérisés, plusieurs études ont permis de mettre en évidence différentes voies menant à l'inhibition de la transcription, que ce soit au niveau des DSB ou à distance de celles-ci. De façon importante, ces voies reposent en grande partie sur des modifications de la chromatine (Adam and Polo, 2014).

B1. Inhibition de la transcription aux DSB

- De façon dépendante d'ATM

De façon intéressante, les DSB survenant au niveau de gènes de l'ADN ribosomique (rDNA) provoquent une répression transcriptionnelle de façon dépendante d'ATM (Kruhlak et al., 2007). De plus, la quantification de 5FU, un analogue de la thymidine, a montré que la marque de chromatine répressive H3K9me3, établie par le complexe HUSH, est également nécessaire à la répression de la transcription du rDNA post-DSB (Marnef et al., 2017). Cependant, il reste à établir si le complexe HUSH est recruté aux DSB du rDNA grâce à ATM ou grâce à une voie alternative. De façon intéressante, la répression transcriptionnelle des gènes endommagés dans le rDNA nécessite la présence des cohésines, même si le mécanisme impliqué reste encore inconnu (Marnef et al., 2017).

- De façon dépendante de PARP

Une autre voie, dépendante de PARP, entraîne la répression transcriptionnelle aux sites de dommages. En effet, suite à l'induction de dommages par UV grâce à un laser, des expériences d'immunofluorescence ont mis en évidence une diminution du niveau de transcrits naissants aux sites de dommages (Chou et al., 2010). Cette inhibition de la transcription est dépendante de PARP, qui recrute les complexes Polycomb et le complexe NuRD (Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation) aux sites de dommage pour inhiber la transcription. Les complexes NuRD et Polycomb ont une fonction déjà connue de répresseur de la transcription dans des conditions sans dommage et permettent la répression transcriptionnelle grâce à des modifications de la chromatine (Bracken et al., 2019).

INTRODUCTION

- De façon dépendante de DNA-PK

D'autre part, l'inhibition de la transcription au niveau des DSB dépend également de DNA-PK. En effet, l'étude de l'induction de DSB par une enzyme de restriction (I-Ppol) a montré pour la première fois une inhibition de la transcription des gènes endommagés de façon dépendante de DNA-PK et du protéasome (Caron et al., 2019; Pankotai et al., 2012). Les auteurs proposent que DNA-PK permettrait un recrutement du protéasome pour dégrader la RNA POLII en cours de transcription.

- De façon dépendante d'ATM ou PARP ?

Une autre voie conduisant à l'inhibition de la transcription des gènes endommagés a été mise en évidence. En effet, l'histone déméthylase KDM5A peut être recrutée aux DSB pour déméthyliser H3K4me3 (Gong et al., 2017). Cela permet le recrutement du complexe NuRD au niveau des DSB pour déacétyler les histones et ainsi réprimer la transcription en cours (Gong et al., 2015). Cette voie de répression de la transcription pourrait dépendre de PARP et/ou d'ATM puisque ces deux enzymes ont été impliquées dans le recrutement du complexe NuRD au niveau des dommages (Chou et al., 2010; Polo et al., 2010).

B2. Inhibition de la transcription en cis des DSB

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence une répression des gènes qui ne sont pas directement touchés par les DSB mais qui se trouvent en *cis* de celles-ci. Un système rapporteur a été développé pour étudier l'inhibition de la transcription en *cis* des DSB. Ce système rapporteur, présent en multiple copies, possède un site clivable par une enzyme de restriction, qui est situé entre 4 et 13kb d'un gène inducible qui code pour un ARN à structure particulière en tige-boucle, reconnue spécifiquement par la protéine MS2-YFP.

Grâce à ce système, il a été montré que l'induction de DSB provoque une forte diminution de la transcription du gène rapporteur en *cis*, associée à une pause de l'élongation par la RNA POLII. (Shanbhag et al., 2010). Une autre étude a validé par RNA-seq la répression de gènes situés au niveau ou en *cis* de DSB induites sur des sites annotés du génome et a démontré que le niveau de répression transcriptionnelle décroît linéairement avec la distance par rapport aux DSB (Iannelli et al., 2017). Cette inhibition de la transcription en *cis* dépend d'ATM. En effet, ATM promeut le recrutement des ubiquitine ligases RNF8 et RNF168 ainsi que du complexe remodelleur de la chromatine PBAF et des complexes répresseurs Polycomb, qui

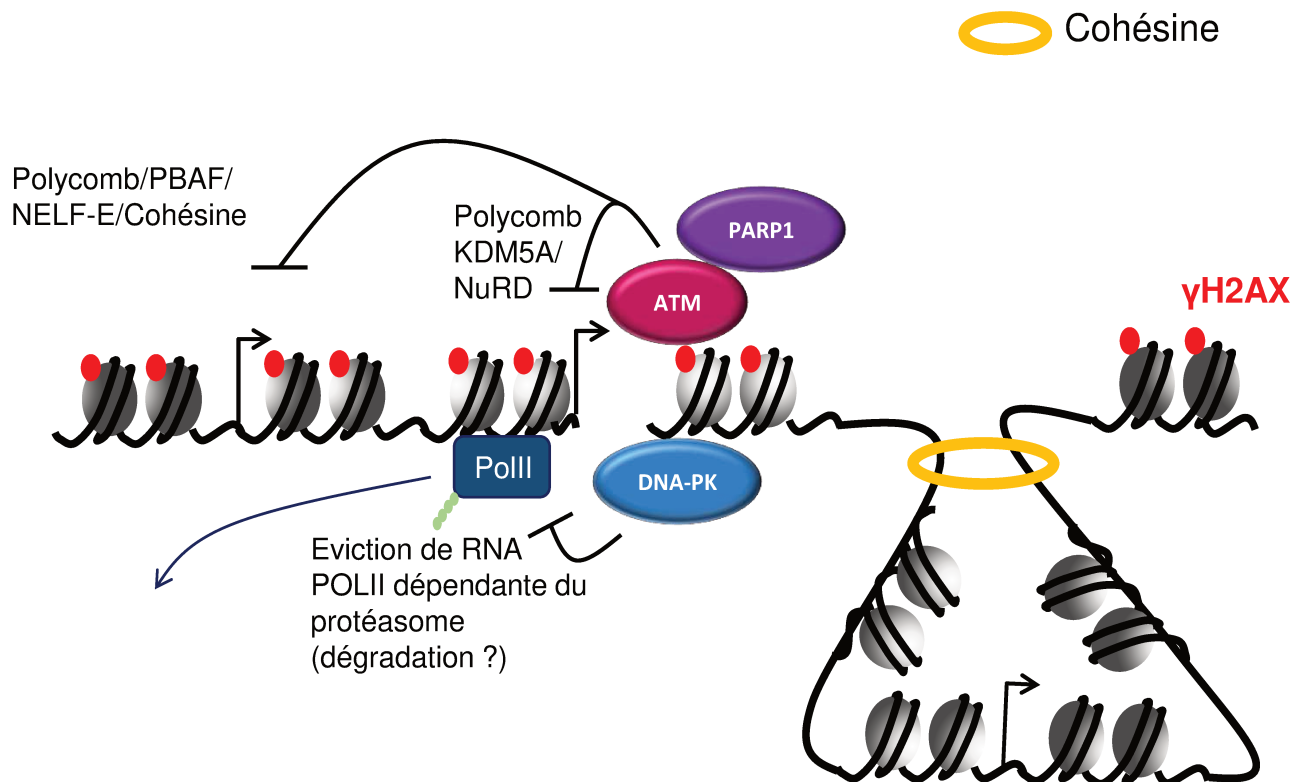


Figure 20 : Extinction de la transcription des gènes aux DSB et en cis.

La transcription des gènes endommagés ou proches de la DSB est inhibée tandis que d'autres gènes en *cis* sont protégés de l'inhibition de la transcription grâce au complexe des cohésines, potentiellement en isolant les gènes actifs dans une boucle de chromatine.

INTRODUCTION

ubiquitylent les histones H2A (en lysine 119), marque d'histone conduisant à la répression transcriptionnelle (Kakaroukas et al., 2014; Shanbhag et al., 2010; Ui et al., 2015).

D'autre part, l'inhibition de la transcription en *cis* est également établie grâce à PARP1. En effet, grâce au système rapporteur précédemment décrit, il a été montré que l'induction de DSB provoque une inhibition de la transcription de façon dépendante de PARP1 (Awwad et al., 2017; Polo, 2017). Dans ce contexte, PARP1, potentiellement grâce à la parylation de la RNA POLII, permet le recrutement près des sites de dommage de NELF-E, facteur connu comme étant impliqué dans l'inhibition de l'élongation de la transcription.

Enfin, toujours à l'aide de ce système rapporteur, il a été montré que les cohésines et NIPBL sont également impliqués dans la répression transcriptionnelle de gènes en *cis* de la DSB (Meisenberg et al., 2019). Cependant, tout comme pour le rôle des cohésines dans la répression transcriptionnelle des gènes endommagés, le mécanisme reste à être établi. Les cohésines étant des cibles de phosphorylation d'ATM, il est possible qu'ATM soit également impliquée dans cette voie (Kim et al., 2002b).

Cependant, deux études ont montré grâce à des RNA-seq ou à des CHIP de RNA POLII que, contrairement aux gènes directement endommagés, les gènes proches, contenus dans les domaines γ H2AX ne sont pas réprimés suite à l'induction de DSB par des enzymes de restriction (Iacovoni et al., 2010; Kim et al., 2016). En effet, notre laboratoire a montré que le maintien de la transcription des gènes proches des DSB est dû à la présence de cohésines sur ces gènes (Caron et al., 2012). L'hypothèse proposée était que les cohésines protègeraient la transcription des gènes en *cis* des DSB en les isolant du foyer de réparation (Figure 20).

L'existence d'études contradictoires quant à l'inhibition de la transcription en *cis* des DSB suggère que, selon des critères qui restent à être déterminés, certains gènes proches des DSB ne seraient pas réprimés suite à l'apparition de DSB alors que d'autres seraient affectés. De façon très intéressante, dans les deux situations, les cohésines semblent jouer un rôle très important (Caron et al., 2012; Marnef et al., 2017; Meisenberg et al., 2019).

En conclusion, il apparaît très clairement que les compositions de la chromatine préexistante et de la chromatine induite par la présence de DSB jouent un rôle majeur dans les différentes étapes de la réparation des DSB. Cependant le rôle de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine dans la réparation n'est encore que très peu compris.

III. Rôle de l'organisation 3D de la chromatine dans la réparation des DSB

1. Modifications de la chromatine en réponse aux DSB

A. Modification du paysage chromatinien après dommages

Suite à l'induction de DSB dans le génome, le paysage chromatinien est profondément remodelé autour des DSB afin de favoriser la réparation par HR ou par NHEJ (Clouaire and Legube, 2019). En effet, la cartographie des modifications d'histones en ChIP-seq autour de DSB dont la position est connue sur le génome a permis d'identifier des modifications locales autour des DSB (<10kb) mais également des modifications sur des domaines plus importants (~1Mb) (Clouaire et al., 2018). Comme mentionné dans la partie précédente, la chromatine est modifiée en cis, par exemple pour inhiber la transcription des gènes proches. Un autre exemple est la diminution de l'ubiquitinylation de l'histone H2BK120 sur 2-3 kb au profit de son acétylation, marque plus active de la chromatine. A l'inverse, des protéines hétérochromatiniennes telles que HP1, KAP1 et la méthyltransférase Suv39h1 sont recrutées au niveau des DSB pour méthyle H3K9, marque répressive de la chromatine (Ayrapetov et al., 2014). La méthylation d'H3K9 est également réalisée par la méthyltransférase PRDM2, recrutée grâce au variant d'histone macroH2A1.2, qui s'accumule aux DSB de façon dépendante d'ATM (Khurana et al., 2014).

A l'échelle du mégabase, comme mentionné en partie II, il est observé une accumulation de la phosphorylation d'H2AX et de l'ubiquitinylation de la chromatine, ainsi qu'une déplétion de l'histone linker H1 (Clouaire et al., 2018; Strickfaden et al., 2016). Cette déplétion de H1 peut s'expliquer par la diminution de son interaction avec le reste de la chromatine suite à son ubiquitinylation par RNF8 (Thorslund et al., 2015). La façon dont ces marques de chromatine sont établies sur un si grand domaine, ainsi que le rôle de cette propagation restent inconnues. Néanmoins il est possible d'imaginer qu'étant donné le rôle des modifications d'histones sur la compaction de la chromatine, celle-ci va être profondément affectée par l'apparition de DSB.

B. Compaction et décompaction de la chromatine après dommages

B1. Une phase initiale de décompaction de la chromatine en réponse aux dommages

Le suivi de l'histone H2B-GFP phospho-activable par microscopie a permis de mettre en évidence une relaxation de la chromatine après induction de dommages localisés par un laser UV, qui active également la GFP (Kruhlak et al., 2006). Cette décompaction de la chromatine est associée à une augmentation de la sensibilité de l'ADN à la nucléase micrococcale (MNase), c'est-à-dire à une diminution de la quantité de nucléosomes sur l'ADN ou à une diminution d'interaction entre les nucléosomes (Ziv et al., 2006).

Il semble qu'il existe différents mécanismes mis en œuvre pour conduire à cette augmentation de l'accessibilité de l'ADN. En effet, certaines études observent un rôle d'ATM dans cette relaxation de la chromatine (Ziv et al., 2006) alors que d'autres témoignent d'une décompaction ATM-indépendante (Kruhlak et al., 2006).

Concernant la relaxation dépendante d'ATM, celle-ci est assurée par la délocalisation de la protéine hétérochromatinienne KAP1 grâce à sa phosphorylation par ATM (Ziv et al., 2006). D'autre part, une décompaction de la chromatine pourrait aussi être expliquée par la déplétion de l'histone H1 autour des DSB évoquée précédemment.

Par ailleurs, il a été mis en évidence une décompaction dépendante de la phosphorylation par PARP1 (Luijsterburg et al., 2016; Strickfaden et al., 2016). Celle-ci pourrait d'une part participer à l'éviction de H1, mais également conduire à l'ajout des histones H3.3 dans la chromatine (Adam et al., 2016; Luijsterburg et al., 2016), ce qui pourrait inhiber la stabilité des nucléosomes sur l'ADN. Cela pourrait constituer le mécanisme ATM-indépendant car PARP1 est recruté très précocement aux DSB, et précède probablement le recrutement d'ATM.

B2. La recompaction de la chromatine après la phase initiale de décompaction

D'après certaines études, cette relaxation de la chromatine est suivie d'une phase de compaction (Ayrapetov et al., 2014; Burgess et al., 2014; Khurana et al., 2014). Cette compaction transitoire est due au recrutement des protéines hétérochromatiniennes mentionnées précédemment (HP1, KAP1, H3K9me2/3). De façon importante, la décompaction suivie de cette forte compaction de la chromatine sont nécessaires à la mise en

INTRODUCTION

place de la DDR. Cependant, la taille des domaines de chromatine concernés par ces évènements est incertaine.

En conclusion, le paysage chromatinien et l'état de compaction de la chromatine sont fortement remodelés suite à l'apparition de DSB dans le génome, parfois sur de très larges régions de chromatine pour ce qui est des modifications d'histones (de l'ordre du mégabase). De façon importante, ces modifications pourraient très vraisemblablement avoir un effet sur les propriétés de la chromatine, telles que son organisation en trois dimensions ainsi que sur sa dynamique et donc sa mobilité dans le noyau. Dans la suite de ce chapitre seront donc discutés les liens entre l'organisation 3D de l'ADN et la réparation, puis la mobilité de la chromatine induite par la présence de DSB.

2. Rôle de l'organisation 3D de la chromatine dans la réparation des DSB

Plusieurs études tendent à démontrer un rôle de la conformation de la chromatine dans la réparation des DSB. Par exemple, chez la levure, la proximité spatiale initiale entre les DSB et leur séquence d'homologie est très importante pour la réparation efficace des DSB par HR (Agmon et al., 2013; Lee et al., 2016). Des expériences de Hi-C ont permis de déterminer les interactions préexistantes à l'échelle du génome entier chez la levure. Les auteurs ont tiré avantage de ces informations pour placer des sites d'homologie « donneurs » à différentes distances spatiales du site de dommage (Lee et al., 2016). De façon intéressante, l'interaction préexistante entre la DSB et sa séquence donneur est fortement corrélée avec l'efficacité de recombinaison homologue, indiquant un rôle de l'organisation spatiale du génome dans la réparation par HR.

Le génome étant organisé dans l'espace nucléaire en une succession de TAD (voir partie I), la question se pose alors de quel est le rôle spécifique des TAD dans la réparation et comment leur structure est affectée par l'apparition de DSB dans le génome ?

γ H2AX establishment

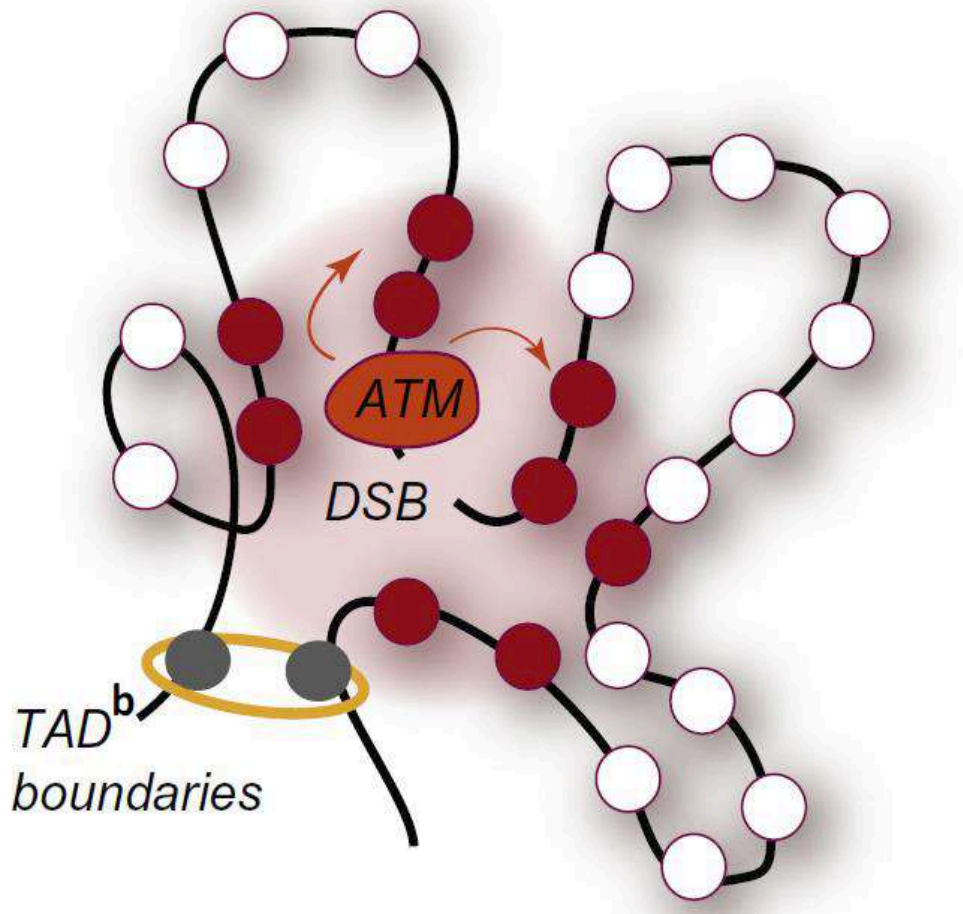


Figure 21: Modèle de propagation de γ H2AX dans un TAD entier

La conformation initiale de la chromatine en 3D pourrait dicter l'établissement et la propagation de γ H2AX après l'apparition d'une DSB. Dans ce modèle, ATM pourrait phosphoryler H2AX sur les régions initialement spatialement proches de la DSB, donc à l'intérieur d'un TAD entier.

A. Rôle des TAD dans la réparation

A1. Rôle des TAD préexistants dans la réparation

L'organisation tridimensionnelle de la chromatine autour des DSB est encore très peu comprise. La question s'est longtemps posée de savoir comment γ H2AX, marqueur le plus utilisé des DSB, était capable d'être propagé si loin de la DSB (jusqu'à 1Mb), formant ainsi un foyer de réparation très large. Il a été proposé récemment que γ H2AX pourrait être propagé sur un TAD entier (Arnould and Legube, 2020; Aymard and Legube, 2016; Marnef and Legube, 2017). En effet, les frontières des domaines γ H2AX corrélaient avec les frontières des TAD (Caron et al., 2012) et les TAD sont de tailles similaires aux domaines γ H2AX (Iacovoni et al., 2010; Lieberman-Aiden et al., 2009). De plus, l'utilisation de l'imagerie à haute-résolution a montré une propagation de 53BP1 sur plusieurs TAD ou sous-TAD observés par DNA FISH, ainsi qu'un enrichissement de la protéine CTCF, impliquée dans les frontières de TAD, autour des foyers γ H2AX (Natale et al., 2017; Ochs et al., 2019). De façon intéressante, la déplétion de CTCF entraîne un défaut d'établissement des foyers γ H2AX, suggérant un rôle de CTCF dans la formation des foyers de réparation.

Enfin, comme mentionné en partie II, les domaines γ H2AX ne sont pas homogènes puisqu'ils contiennent des pics et des creux de γ H2AX. En effet, chez l'homme et chez la levure, il a été montré grâce à des techniques de CHIP sur des DSB annotées que γ H2AX n'est pas établi sur les gènes actifs contenus dans les foyers de réparation, conduisant à l'apparition de creux de γ H2AX (Iacovoni et al., 2010; Lee et al., 2014). Chez la levure, l'arrêt contrôlé de la transcription de ces gènes suffit à rétablir γ H2AX dans ces régions (Lee et al., 2014). De façon importante, nous avons montré au laboratoire que chez l'homme, cette déplétion de γ H2AX des gènes actifs est assurée par les cohésines, montrant que les cohésines, tout comme CTCF, ont un rôle important dans la propagation de γ H2AX autour des DSB (Caron et al., 2012).

L'ensemble de ces observations indiquent une corrélation entre les TAD et les foyers de réparation et soulèvent ainsi la possibilité que des processus de réparation se déroulent à l'échelle des TAD. Un modèle possible serait que γ H2AX soit déposé sur un TAD entier grâce aux interactions intra-TAD entre la DSB et le reste du TAD (Figure 21) (Arnould and Legube, 2020; Aymard and Legube, 2016; Marnef and Legube, 2017). Ce modèle est également appuyé par le fait que chez la levure, γ H2AX est capable de se propager sur des régions

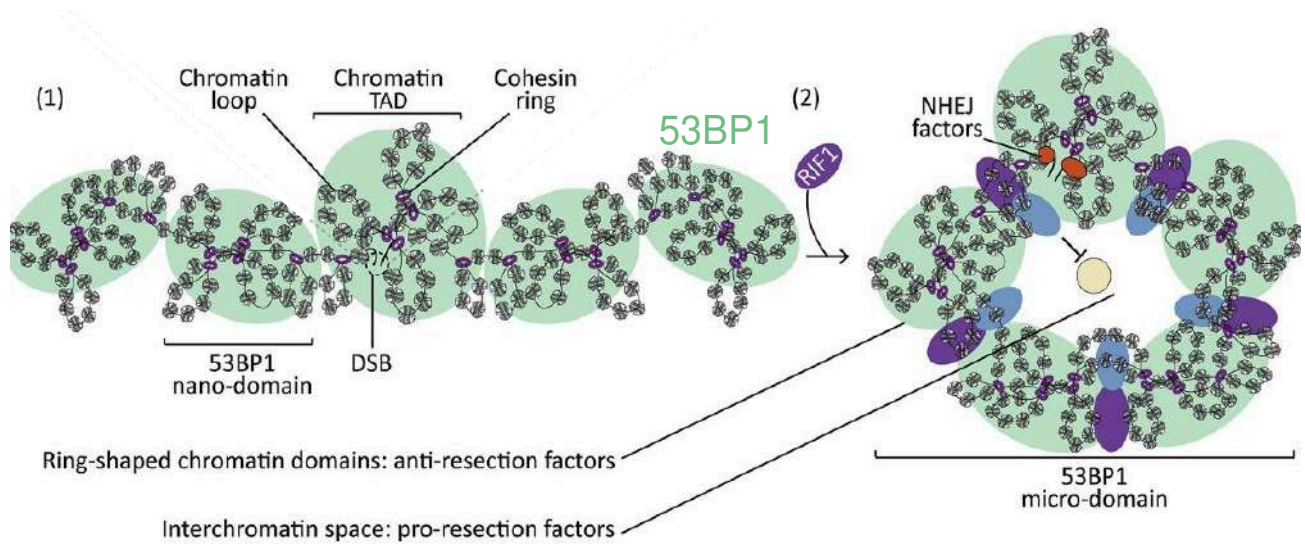


Figure 22 : Modèle de réorganisation des TAD DSB-dépendant.

D'après ce modèle, après l'induction de DSB, 53BP1 est recruté sur plusieurs TAD avoisinant le TAD endommagé (figure d'après Caron and Polo, 2020, étude de Ochs et al., 2019). Le recrutement de RIF1 aux frontières de ces TAD permettrait par la suite de circulariser le domaine 53BP1. Cette organisation circulaire permettrait de contenir les étapes de résection, évitant ainsi une résection aberrante et potentiellement délétère.

INTRODUCTION

d'autres chromosomes, qui sont proches physiquement dans le noyau (les centromères) (Lee et al., 2014).

A2. Remodelage des TAD en réponse aux DSB

Récemment, afin de déterminer l'organisation en 3D de la chromatine autour des DSB, le laboratoire de Jiri Lukas a réalisé une étude en microscopie à haute-résolution (Ochs et al., 2019; Caron and Polo, 2020). Les auteurs ont pu observer la formation de domaines γ H2AX/53BP1, composés de plusieurs nano-domaines (Figure 22). Ces nano-domaines ont également pu être observés par un autre laboratoire avec le marquage γ H2AX (Natale et al., 2017). De façon intéressante, chaque nano-domaine composant le domaine γ H2AX/53BP1 semble correspondre à un TAD ou un sous-TAD en DNA-FISH. Enfin, ces différents nanodomains/TAD s'organisent en cercle autour de chaque DSB de façon dépendante des cohésines et d'un recrutement de RIF1, le co-facteur de 53BP1, au niveau des frontières de TAD. D'après cette étude, cette organisation en cercle est notamment essentielle dans la limitation de la résection. En effet, une déplétion des cohésines entraîne une déstructuration du cercle et une résection excessive.

Néanmoins, il est à noter que γ H2AX et 53BP1 ne sont présents à la chromatine qu'après induction de dommages. Ce remodelage des TAD observé en réponse aux DSB, bien qu'intéressant serait donc à confirmer et à étudier davantage dans un contexte où l'on possède également, à titre de comparaison, l'information de l'organisation de la chromatine avant l'induction des DSB.

Enfin, l'hypothèse d'un remodelage des TAD dans la réparation des DSB est également soutenue par de nombreuses observations indiquant un recrutement des cohésines et de CTCF aux DSB, ainsi qu'un rôle de ces protéines dans la réparation.

B. Recrutement et rôle des cohésines dans la réparation des DSB

B1. Accumulation des cohésines aux DSB

De nombreuses études ont recensé un recrutement des cohésines aux sites de dommages, que ce soit chez l'homme ou chez la levure (Caron et al., 2012; Kim et al., 2002a; Unal et al., 2004). Ce recrutement des cohésines aux DSB est dépendant d'ATM et du complexe MRN (Litwin et al., 2018). Cependant, chez la levure, les cohésines sont recrutées sur un très large domaine autour des DSB, similaire à γ H2AX (Unal et al., 2004), alors qu'elles ne sont recrutées

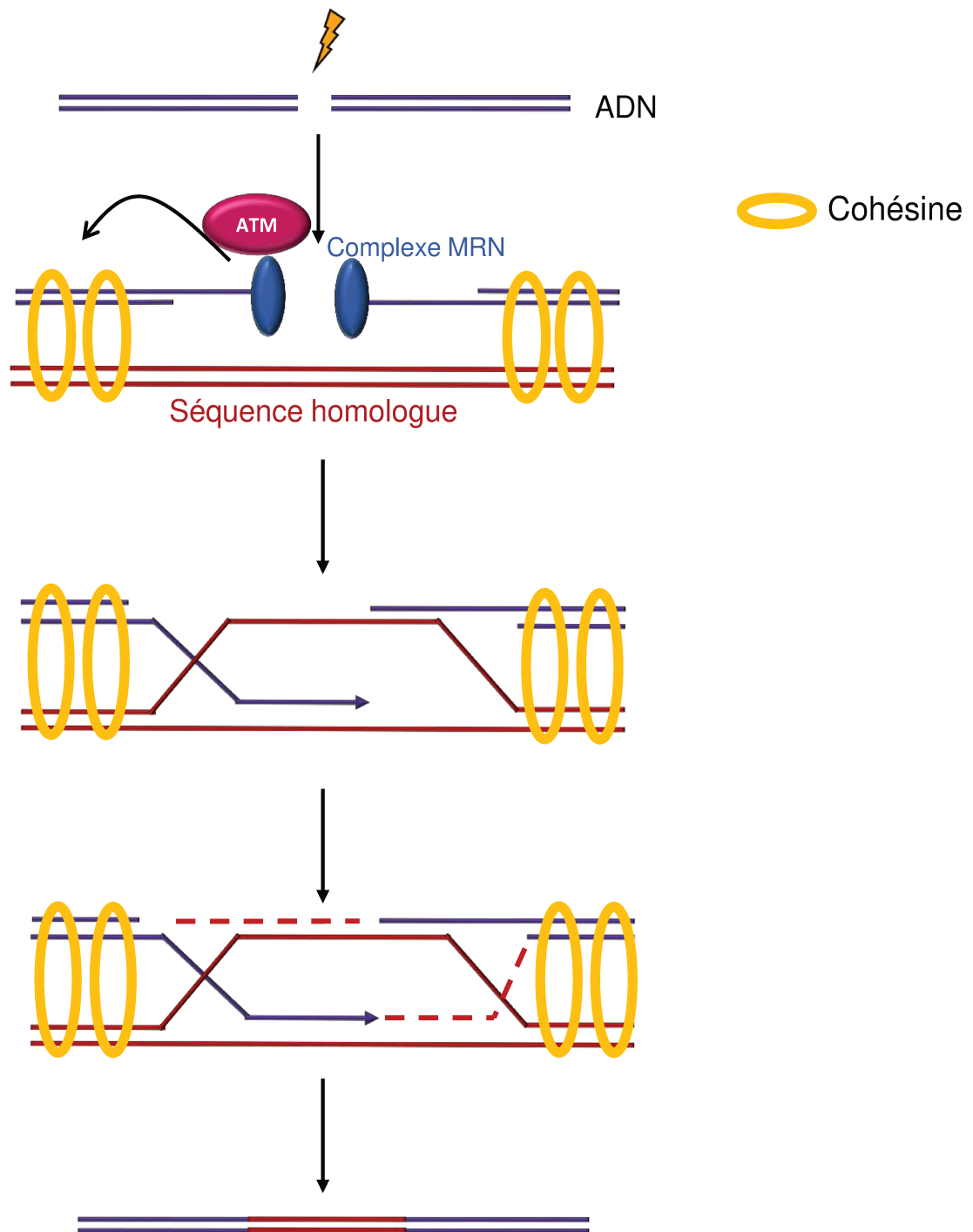


Figure 23: Modèle du rôle des cohésines dans la réparation en S/G2.

Selon ce modèle, les cohésines seraient recrutées aux DSB de façon dépendante d'ATM et du complexe MRN. Elles permettraient alors de maintenir les chromatides sœurs proches pour faciliter les étapes de la recombinaison homologue, mécanisme nécessitant la chromatide sœur comme matrice pour la réparation.

INTRODUCTION

que sur quelques kilobases chez l'homme (Caron et al., 2012). De plus, chez la levure, le recrutement des cohésines aux DSB n'est observé qu'en S/G2 (Strom et al., 2017), alors que chez l'homme, les cohésines peuvent également s'accumuler aux DSB en G1 (Caron et al., 2012; Meisenberg et al., 2019). Cela signifie que les mécanismes de recrutement des cohésines aux DSB ne sont pas forcément similaires entre les deux espèces.

De façon intéressante, une accumulation de NIPBL aux sites de dommages est également observée en imagerie (Bot et al., 2017; Kong et al., 2014; Oka et al., 2011). Ce recrutement de NIPBL est dépendant des kinases ATM et ATR, des ubiquitine-ligases RNF8 et RNF168 et de HP1 γ avec lequel NIPBL a un domaine d'interaction (Bot et al., 2017; Oka et al., 2011). Bien qu'il ait été proposé que le recrutement de NIPBL aux DSB permette le chargement des cohésines de novo aux sites endommagés, une étude a montré que les cohésines sont également nécessaires au recrutement de NIPBL aux DSB (Kong et al., 2014). Cela indique que les mécanismes de recrutement des cohésines et de NIPBL aux DSB ne sont pas encore totalement compris.

B2. Rôle des cohésines dans la réparation des DSB

Depuis de nombreuses années, les cohésines ont été associées à la réparation des DSB. En effet, des mutations de sous-unités du complexe cohésine ou de NIPBL, la protéine qui permet le chargement des cohésines sur l'ADN, conduisent à une hypersensibilité aux irradiations, signe d'un défaut de réparation de l'ADN (Bauerschmidt et al., 2011; Kim et al., 2002; Vrouwe et al., 2007). De plus, les cohésines sont impliquées dans l'activation des checkpoints des phases S et G2/M (Watrinn and Peters, 2009). Néanmoins les mécanismes mis en jeu pour favoriser la réparation et activer les checkpoints restent mal compris.

Il a été proposé, principalement chez la levure, que les cohésines pourraient permettre la cohésion des chromatides sœurs en S/G2 pour faciliter la HR (Figure 23) (Potts et al., 2006). Cette cohésion faciliterait l'utilisation de la chromatide sœur comme matrice pour la recombinaison homologue et limiterait l'utilisation du chromosome homologue, qui peut aboutir à une perte d'hétérozygotie (Covo et al., 2010). Les cohésines permettent également d'inhiber la jonction entre des DSB distantes de quelques kilobases afin d'inhiber la formation de réarrangements chromosomiques (Gelot et al., 2016).

Enfin, comme mentionné précédemment, les cohésines sont impliquées dans l'inhibition de la transcription de certains gènes proches des DSB en G1 comme en G2 (Marnef et al., 2019;

INTRODUCTION

Meisenberg et al., 2019) et dans le maintien de l'expression d'autres gènes situés dans les foyers de réparation (Caron et al., 2012).

Modifications des cohésines post-DSB

De façon intéressante chez l'homme et non chez la levure, des phosphorylations des cohésines en réponse à l'apparition de DSB dans le génome ont été observées (Kim et al., 2002). SMC1 peut en effet être phosphorylée par ATM sur ses résidus sérine 957 et/ou 966 alors que SMC3 est phosphorylée par ATM sur sa sérine 1083. En réponse aux irradiations, SMC3 peut également être acétylée par ESCO1 (Kim et al., 2010).

Concernant le rôle de ces modifications des cohésines, des expériences de ChIP-seq ont montré qu'après irradiations, les cohésines peuvent s'accumuler sur tous leurs sites de fixation endogènes à l'échelle du génome entier et que cette accumulation est dépendante de leurs propres phosphorylations et acétylations (Kim et al., 2010). Cependant, l'induction de DSB par irradiations ne permet pas de connaître la position des DSB et donc ne permet pas de comprendre si l'accumulation des cohésines sur leurs sites de fixation se produit autour des DSB ou à l'échelle du génome entier. D'autre part, la phosphorylation des cohésines suite à l'induction de DSB augmente la mobilité des cohésines analysée par FRAP, phénomène utilisant probablement de l'ATP (Bauerschmidt et al., 2011). Bien que le rôle de la phosphorylation des cohésines dans la réparation ne soit que peu compris, leur présence est nécessaire à la survie cellulaire suite à l'induction de DSB (Kim et al., 2002).

C. Recrutement et rôle de CTCF dans la réparation des DSB

Tout comme les cohésines, CTCF est recruté au niveau des sites de dommages de façon dépendante d'ATM (Han et al., 2017; Hilmi et al., 2017; Hwang et al., 2019; Lang et al., 2017).

De façon intéressante, CTCF est important pour la réparation des DSB puisque sa déplétion entraîne un défaut de la survie cellulaire après induction de dommages et une persistance des DSB, signe d'une cinétique de réparation plus lente (Han et al., 2017; Hilmi et al., 2017; Natale et al., 2017). CTCF participe notamment à la réparation en permettant le recrutement de la protéine Rad51 aux DSB, montrant son rôle dans la réparation des DSB par HR. En effet, l'utilisation de systèmes rapporteurs de la HR et de la NHEJ ont pu confirmer que CTCF favorise la réparation par HR et inhibe la réparation par NHEJ (Hilmi et al., 2017; Hwang et al., 2019; Lang et al., 2017).

INTRODUCTION

Pour comprendre exactement comment CTCF favorise la réparation par HR, une équipe a mis en évidence un recrutement de CTCF aux DSB grâce à son interaction avec le complexe MRN (Hwang et al., 2019). CTCF interagit également avec CtIP pour participer à son recrutement aux DSB et ainsi à l'initiation de la résection, phénomène connu comme conduisant à la réparation par HR, au détriment de la NHEJ. Cependant, l'effet de la déplétion de CtIP sur la survie cellulaire après dommages est beaucoup moins important que la déplétion de CTCF, suggérant que CTCF pourrait participer à la réparation des DSB via plusieurs mécanismes. Ces autres fonctions de CTCF dans la réparation doivent encore être déterminées. Néanmoins, étant donné le rôle mentionné précédemment de CTCF dans l'établissement des foyers γ H2AX, une hypothèse serait que CTCF participe à la réparation des DSB en recrutant CtIP et en favorisant l'établissement des foyers γ H2AX.

Un grand nombre d'observations mettent en évidence un lien entre la structure 3D du génome et les foyers de réparation. Néanmoins, la fonction de ces grands foyers de réparation, potentiellement à l'échelle des TAD, reste mal comprise. Il est possible d'envisager que l'établissement de ces grands domaines de chromatine modifiée aient un rôle sur la dynamique de la chromatine et donc sur sa mobilité au sein du noyau.

3. La mobilité des DSB dans le noyau

Bien que largement acceptée chez la levure, la capacité d'une DSB à être mobile dans le noyau a été longtemps controversée chez les mammifères.

En effet, plusieurs études ont rapporté une absence d'induction de mobilité des loci endommagés chez les mammifères (Kruhlak et al., 2006; Soutoglou et al., 2007). D'une part, le suivi d'histone H2B-GFP phospho-activable ne montre pas de mobilité des DSB après production de dommages localisés par un laser UV, qui active également la GFP (Kruhlak et al., 2006). D'autre part, des cellules de souris exprimant une construction comportant une DSB unique flanquée des répétitions des séquences TetO et LacO, reconnues respectivement par les répresseurs TetR et LacR fusionnés à des protéines fluorescentes, ne montrent pas non plus de mobilité de la DSB, visualisée par vidéomicroscopie en temps réel (Soutoglou et al., 2007).

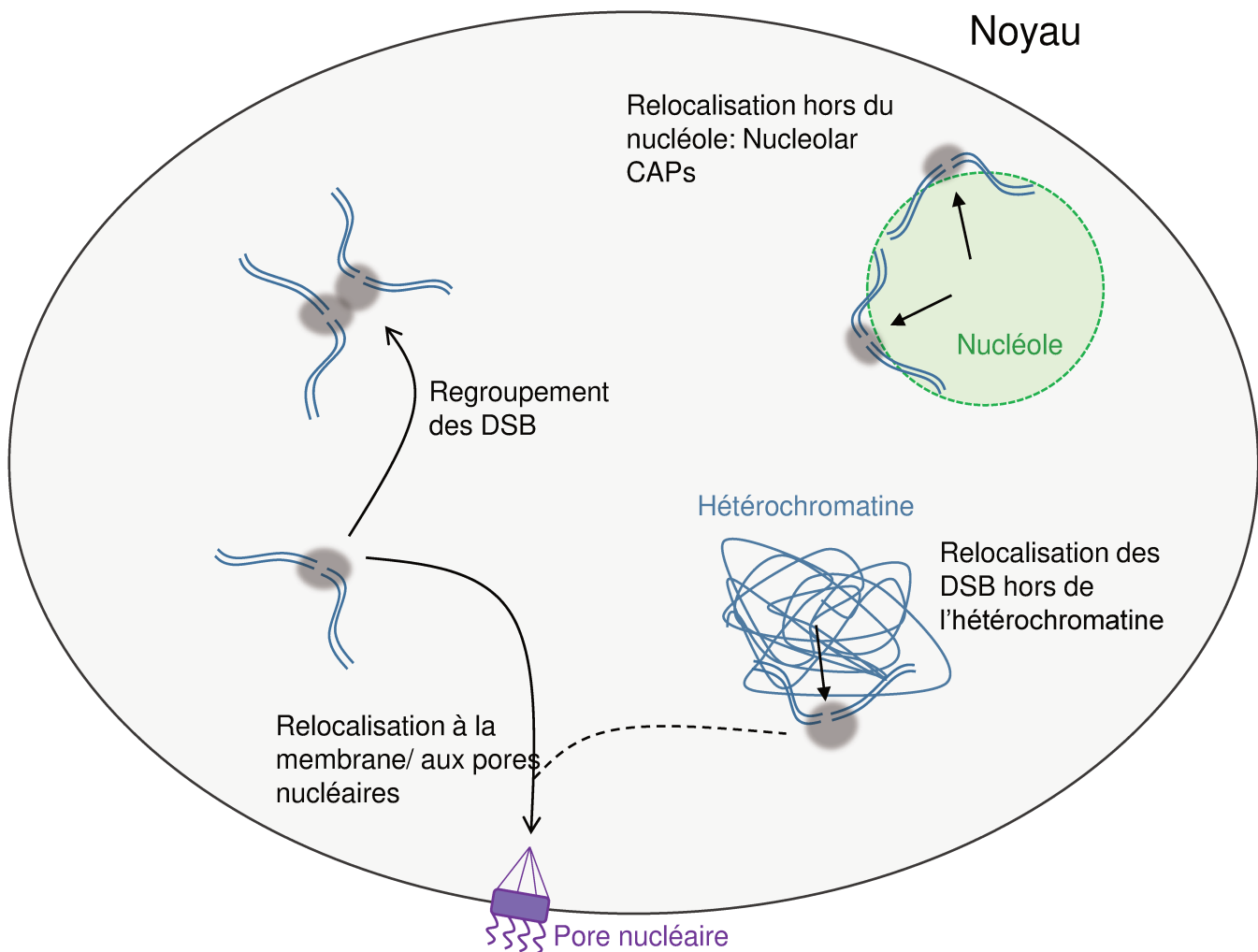


Figure 24: La mobilité des DSB dans le noyau.

Les DSB survenant dans l'euchromatine sont capables de se regrouper entre elles ou d'aller en périphérie du noyau aux pores nucléaires lorsqu'elles sont persistantes. Les DSB survenant dans le nucléole ou l'hétérochromatine sont relocalisées à l'extérieur de leur environnement d'origine en S/G2 pour être réparées par HR. Chez la drosophile, les DSB hétérochromatiniennes peuvent ensuite être également relocalisées aux pores nucléaires.

INTRODUCTION

Au contraire, de nombreuses études tendent à démontrer une mobilité des DSB chez la levure, la drosophile et chez les mammifères.

A. Les observations en faveur de la mobilité des DSB

Chez la levure, le suivi en vidéo-microscopie en temps réel de loci endommagés a montré une augmentation de leur mobilité, contrairement à des loci non endommagés, qui parcourent ainsi une plus grande distance au sein du noyau. La mobilité des DSB dépend de Rad51 et Mec1, l'homologue d'ATR chez la levure (Dion et al., 2012; Lisby et al., 2003). De façon intéressante, il a également été observé chez la levure que les loci non endommagés présentent une mobilité accrue, bien que moins importante que celle observée pour un locus endommagé (Miné-Hattab and Rothstein, 2012; Seeber et al., 2013). Ceci suggère une augmentation globale de la dynamique du génome en réponse aux dommages.

Chez l'homme, le suivi en microscopie en temps réel de la protéine 53BP1-GFP après des traitements aux irradiations a mis en évidence une mobilité plus importante des loci endommagés que des régions non endommagées (Krawczyk et al., 2012; Lottersberger et al., 2015). Cette mobilité des loci endommagés dépend d'ATM.

Réconciliant potentiellement les différentes études contradictoires quant à la mobilité des DSB chez les mammifères, il semblerait que la mobilité des DSB ne concerne que certains cas et non pas toutes les DSB du génome. Dans la suite de ce chapitre seront discutés les différents contextes qui montrent une mobilité des DSB.

A1. Le cas de l'exclusion hors de l'hétérochromatine

Comme mentionné précédemment, l'hétérochromatine est un ensemble de régions du génome particulièrement compacté, et riche en régions répétées.

De façon intéressante, chez la souris, tandis que la NHEJ peut s'exercer dans l'hétérochromatine endommagée en G1, des études d'imagerie ont montré qu'en S/G2 les DSB de l'hétérochromatine péri-centromérique sont préférentiellement réparés par HR à la périphérie de l'hétérochromatine (Figure 24) (Fortuny and Polo, 2018). En effet, tandis que la signalisation des DSB grâce à la phosphorylation d'H2AX a lieu dans l'hétérochromatine, la réparation des DSB par HR a lieu suite à la relocalisation des DSB à la périphérie, associée à une décompaction locale de l'hétérochromatine (Jakob et al., 2011; Tsouroula et al., 2016).

INTRODUCTION

De façon intéressante, la résection est réalisée à l'intérieur de l'hétérochromatine et est une étape nécessaire à la relocalisation des DSB (Tsouroula et al., 2016). Enfin, les phases de recrutement de Rad51 et de réparation n'ont lieu qu'une fois la DSB relocalisée en périphérie de l'hétérochromatine.

Chez la drosophile, la réparation de l'hétérochromatine repose principalement sur la réparation par HR. Suite à l'induction de DSB, γ H2AX est également observé dans l'hétérochromatine et les DSB sont également relocalisées en périphérie de l'hétérochromatine. Cette relocalisation dépend de dKDM4A, une histone déméthylase qui déméthyle H3K56me3 dans l'hétérochromatine en réponse aux DSB (Colmenares et al., 2017). Cette déméthylation pourrait être responsable de la décompaction de la chromatine au niveau des DSB (Chiolo et al., 2011). De façon importante, l'inhibition de protéines de la résection entraîne un défaut de décompaction de l'hétérochromatine et de relocalisation des DSB à la périphérie. La résection est donc également nécessaire à la relocalisation des DSB en périphérie pour y poursuivre la réparation. Le lien entre la relaxation de l'hétérochromatine et la relocalisation des DSB n'est cependant pas encore bien compris.

Cette relocalisation pourrait permettre de prévenir des recombinaisons illégitimes entre les séquences répétées contenues dans l'hétérochromatine. En effet, une mauvaise relocalisation des DSB en périphérie conduit à l'apparition d'évènements de recombinaisons aberrantes (Chiolo et al., 2011). Elle pourrait également résulter de la persistance des DSB, qui ne parviennent pas à être réparées par HR dans cet environnement particulier.

A2. Le cas de l'exclusion hors du nucléole

Le nucléole est un compartiment du noyau distinct, bien que ne possédant pas de membrane. Le nucléole est composé de portions de différents chromosomes contenant de nombreuses répétitions de l'ADN ribosomique. De la même façon que pour l'hétérochromatine, des DSB survenant dans le nucléole en S/G2 sont relocalisées à la périphérie du nucléole afin d'y être réparées par HR, formant ce que l'on appelle des « nucleolar caps » (Figure 24) (van Sluis and McStay, 2017). De façon importante, chaque nucleolar cap ainsi formé ne contient l'ADN ribosomique que d'un seul chromosome et se situe à distance des autres caps.

De manière intéressante, les protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle du rDNA suite à l'apparition de DSB, telles que les protéines du complexe HUSH et les cohésines (voir chapitre II) sont également impliquées dans la relocalisation des DSB (Marnef et al.,

INTRODUCTION

2019). A l'inverse, des acteurs de la relocalisation des DSB en périphérie du nucléole (voir partie C. Une mobilité active) n'affectent pas la répression transcriptionnelle. Cela indique que l'inhibition de la transcription est un prérequis pour la formation des nucleolar caps en S/G2 (Harding et al., 2015; Marnef et al., 2019).

Tout comme dans l'hétérochromatine, la résection a lieu à l'intérieur du nucléole. Elle est également un prérequis pour la relocalisation de la DSB en périphérie, où Rad51 pourra être recrutée pour que la réparation par HR soit exercée (Marnef et al., 2019; Mooser et al., 2020; van Sluis and McStay, 2015).

Comme pour l'hétérochromatine, il a été proposé que la relocalisation des DSB à la périphérie du nucléole pourrait permettre de prévenir l'utilisation de chromosomes différents comme séquence d'homologie lors de la HR, évitant ainsi la formation de réarrangements chromosomiques. Néanmoins, d'après une étude la persistance des DSB est nécessaire pour conduire à la formation des nucleolar caps (Harding et al., 2015; Marnef et al., 2019). Il est donc possible que les DSB persistent à cause de l'absence des protéines nécessaires à la HR et soient donc relocalisées pour être finalement réparées.

A3. Le cas de la relocalisation vers la périphérie nucléaire

La périphérie nucléaire, et plus principalement les pores nucléaires, semblent être un environnement favorable à la réparation. Chez la levure ainsi que chez la drosophile, les DSB persistantes sont relocalisées à la membrane nucléaire (Figure 24) (Nagai et al., 2008; Oza et al., 2009; Ryu et al., 2015). Dans le cas de la levure, cette relocalisation a lieu lorsque l'absence ou la trop grande distance de séquence homologue empêche l'utilisation de la HR, mécanisme utilisé en majorité (Nagai et al., 2008; Oza et al., 2009). Chez la drosophile, les DSB survenant dans l'hétérochromatine sont non seulement exclues de cette-dernière mais peuvent également être relocalisées à la périphérie nucléaire pour achever la réparation par HR. Des protéines des pores nucléaires sont d'ailleurs nécessaires à la bonne réparation des DSB, probablement en permettant leur recrutement (Ryu et al., 2015). Chez ces deux espèces, la sumoylation est une modification de la chromatine nécessaire pour la relocalisation des DSB aux pores nucléaires.

Il n'a pas encore été observé de relocalisation à la périphérie nucléaire chez l'humain. Néanmoins, dans le cas des DSB survenant dans le nucléole, des études d'imagerie ont

INTRODUCTION

montré que la membrane nucléaire est proche physiquement des DSB contenues au sein des caps grâce à des invaginations membranaires (Marnef et al., 2019).

B. Le regroupement des DSB

B1. Les preuves du regroupement des DSB

A l'aide d'approches orthogonales, il a été démontré dans plusieurs espèces eucaryotes que certaines DSB sont non seulement mobiles mais qu'elles sont capables de se regrouper dans le noyau, au sein de foyers de réparation communs (Figure 24) (Altmeyer et al., 2015; Aten, 2004; Aymard et al., 2017; Caron et al., 2015; Krawczyk et al., 2006; Lisby et al., 2003; Schrank et al., 2018). Par exemple, l'utilisation de la protéine de fusion 53BP1-GFP a permis de visualiser que différentes DSB peuvent se déplacer au sein du noyau, puis s'associer et se dissocier au cours du temps d'une façon dynamique (Caron et al., 2015; Kilic et al., 2019; Krawczyk et al., 2012). Des observations similaires ont été rapportées chez la levure (Lisby et al., 2003). En effet, deux DSB induites par une nucléase conduisent à la formation d'un seul foyer de réparation couvert par la protéine de réparation Rad52 (impliquée dans la HR). Néanmoins, il existe des résultats contradictoires quant à la phase du cycle cellulaire dans laquelle le regroupement des DSB a lieu.

- Preuves d'un regroupement des DSB en G1

Le regroupement des DSB a été mis en évidence pour la première fois en 2004. L'induction de dommages grâce à des particules α et leur visualisation en microscopie grâce au marquage de γ H2AX a montré, en G1 spécifiquement, une diminution du nombre de foyers γ H2AX et une augmentation de leur taille au cours du temps (Aten, 2004). D'après les auteurs ces résultats sont le signe d'un regroupement de différents foyers de réparation pour ne former qu'un large foyer de réparation commun. En accord avec cette hypothèse, différents sous-domaines de γ H2AX et plusieurs foyers XRCC4 sont distingués au sein de chaque large foyer de réparation, indiquant que plusieurs DSB différentes sont présentes dans ces foyers de réparation communs (Aten, 2004; Caron et al., 2015). D'après ces deux études, l'inhibition d'ATM entraîne une disparition de ces gros foyers de réparation, indiquant qu'ATM est impliquée dans le regroupement des DSB.

INTRODUCTION

Dans une étude de notre laboratoire, l'utilisation d'une lignée cellulaire humaine exprimant une enzyme de restriction inductible produisant des DSB sur des sites annotés (système DivA) et d'une combinaison de microscopie à haut-débit et de capture Hi-C, technique permettant de déterminer toutes les interactions impliquant les 100 DSB induites avec le reste du génome, a permis de déterminer quelles étaient les DSB capables de se regrouper entre elles (Aymard et al., 2017). En effet, d'après cette étude, le regroupement des DSB s'effectue en G1 de façon dépendante du complexe MRN et concerne principalement les DSB situées dans les gènes actifs et donc réparées par HR en S/G2 (voir Chapitre II). De façon intéressante, le blocage des cellules en G1 conduit à un délai de la réparation de DSB identifiées comme étant capables de se regrouper (Aymard et al., 2017). La HR étant inhibée en G1, il a donc été proposé que les DSB deviendraient persistantes et que cela entraînerait leur regroupement au sein de foyers de réparation (Aymard et al., 2017).

Enfin, l'induction de DSB dans des cellules humaines en G0 et G1 conduit à une augmentation des contacts entre chromosomes homologues visualisés par DNA-FISH (Gandhi et al., 2012). Plus spécifiquement, il semblerait que les contacts entre chromosomes homologues se fassent au niveau des DSB des chromosomes homologues, même si la résolution du FISH ne permet pas de connaître l'étendue exacte de la zone de contact. De façon intéressante, le contact entre chromosomes homologues s'effectue si les DSB sont induites dans des gènes. Comme mentionné précédemment, les DSB survenant dans des gènes sont réparées préférentiellement par HR, suggérant ici un contact des chromosomes homologues pour procéder à la HR.

- **Preuves d'un regroupement des DSB en G2**

Dans des cellules humaines, le suivi de la mobilité des DSB grâce à la protéine de réparation RAD52, fusionnée à une protéine fluorescence a permis de montrer en microscopie le regroupement des DSB (Schrank et al., 2018). De façon intéressante, la mobilité des DSB a lieu dans cette étude durant la phase G2 du cycle cellulaire spécifiquement. Dans ce contexte, l'utilisation de lignées rapportrices des différentes voies de réparation a permis de montrer un rôle favorable du regroupement des DSB dans la HR, ainsi qu'une absence d'influence sur la NHEJ. Le regroupement des DSB a également un rôle dans l'étape de résection et dans le recrutement de Rad51 aux DSB, confirmant son rôle dans la HR.

INTRODUCTION

En conclusion, il apparaît que les DSB qui engagent une certaine mobilité (regroupement et relocalisation des DSB) soient principalement les DSB destinées à être réparées par HR, par exemple les DSB survenant dans les gènes. Enfin, il semble que la mobilité des DSB soit également liée à leur cinétique de réparation puisque plusieurs études rapportent une mobilité des DSB persistantes spécifiquement.

B2. Les effets potentiels du regroupement des DSB sur la réparation

- Les bénéfices possibles du regroupement des DSB

Comme cela a été proposé chez la levure, il est possible que le regroupement des DSB permette de créer des compartiments au sein du noyau, qui sont favorables à la réparation des DSB, par exemple en concentrant les protéines de réparation (Lisby et al., 2003).

D'autre part, comme mentionné précédemment, puisque le regroupement des DSB favorise la HR (Schrank et al., 2018), une fonction du regroupement des DSB pourrait être de permettre la recherche d'homologie, comme cela a également été proposé chez la levure (Miné-Hattab and Rothstein, 2012). En effet, dans cette étude, l'induction de DSB provoque une augmentation de la co-localisation en imagerie entre deux séquences homologues. En accord avec cette hypothèse, des DSB induites à l'aide d'une enzyme de restriction dans des télomères de cellules ALT humaines (Alternative Telomere Lengthening) conduisent à un regroupement des télomères de façon dépendante de Rad51. Les télomères des cellules ALT ont besoin d'être réarrangés pour être allongés et leur mobilité permettrait alors la recherche d'homologie puis le regroupement des télomères afin de procéder à la recombinaison entre télomères (Cho et al., 2014).

Enfin, comme évoqué précédemment, un contact des chromosomes homologues est observé en G1 (potentiellement au niveau des sites de dommages), suggérant une recherche d'homologie. Néanmoins, le regroupement des DSB est également observé en G1 entre des DSB de chromosomes différents non homologues, suggérant une autre fonction que la recherche d'homologie (Aymard et al., 2017). Les fonctions de ce regroupement des DSB sont donc encore mal comprises. Néanmoins, étudier les mécanismes et déterminer la phase du cycle où le regroupement des DSB a majoritairement lieu pourrait participer à la compréhension de ce phénomène.

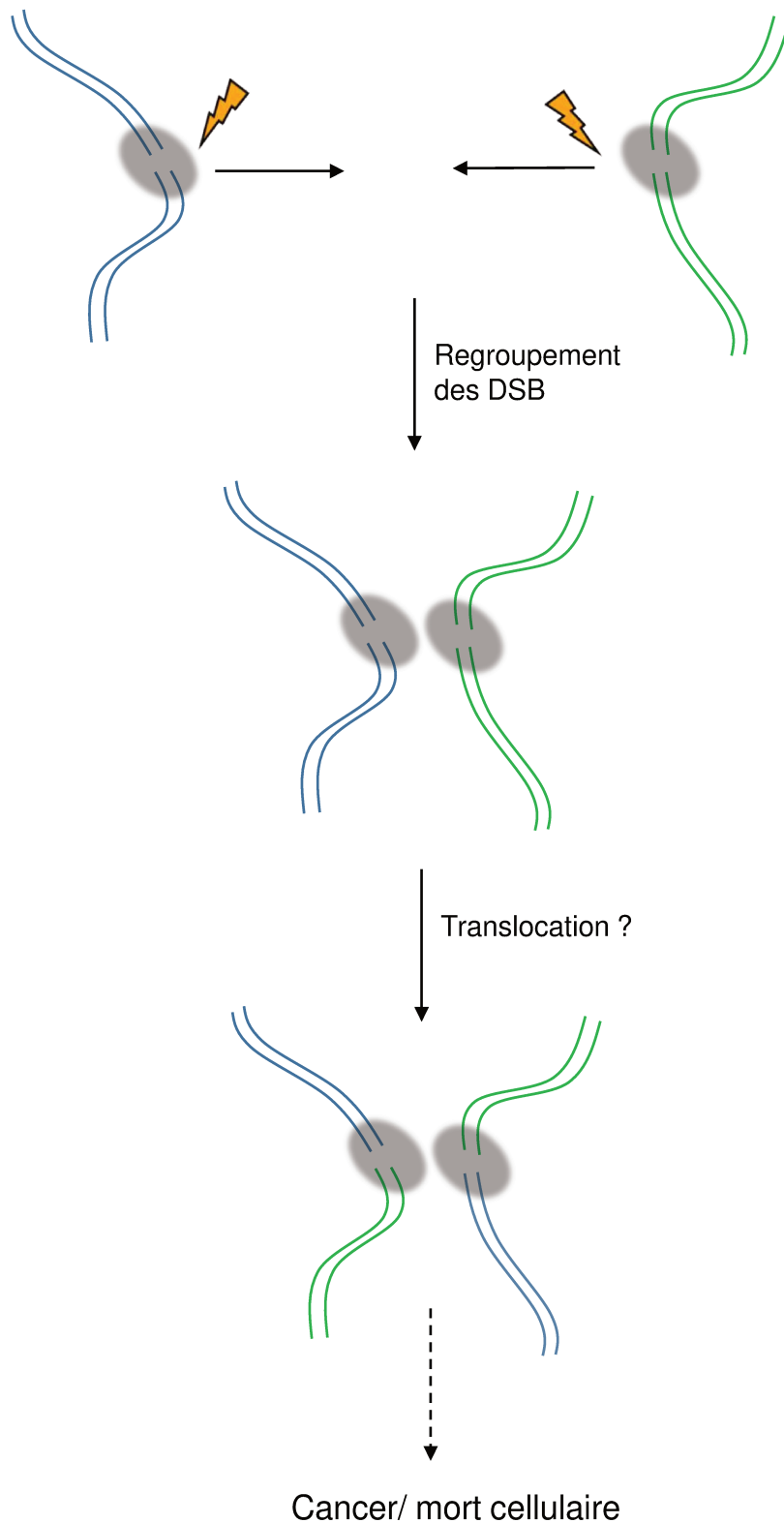


Figure 25: Impact potentiel du regroupement des DSB sur la formation de translocations.

Le rapprochement spatial de plusieurs DSB pourrait conduire à la religation illégitime entre les extrémités de DSB différentes, conduisant à la formation de translocations. Les translocations peuvent ensuite être à l'origine de l'apparition de cancers ou de la mort de la cellule.

INTRODUCTION

- **Les conséquences délétères possibles du regroupement des DSB**

Néanmoins, le regroupement des DSB pourrait également entraîner des effets secondaires néfastes. Il est déjà connu que la proximité initiale de régions génomiques peut favoriser l'apparition de réarrangements chromosomiques entre ces deux régions (i.e. translocations récurrentes) (Meaburn et al., 2007). Il est donc possible d'imaginer que le rapprochement de plusieurs DSB au sein du noyau pourrait également conduire à la formation de réarrangements chromosomiques (Figure 25). En effet, la juxtaposition de plusieurs extrémités d'ADN pourrait provoquer la religation illégitime des extrémités d'ADN de différentes DSB, conduisant à la formation de translocations chromosomiques, d'insertions ou de délétions (Guénolé and Legube, 2017). Ces différents réarrangements chromosomiques seraient potentiellement délétères puisqu'ils pourraient concerner des régions riches en gènes (qui sont enclines à se regrouper) et ensuite être à l'origine de la formation de tumeurs ou de la mort de la cellule.

En accord avec cette hypothèse, l'induction de quatre DSB à des positions distantes dans le génome peut conduire au regroupement de celles-ci et entraîner la formation de translocations (Roukos et al., 2013). Tandis que la co-localisation des DSB observée en imagerie peut être observée jusque dans 12% des cellules, les événements de translocations sont évalués comme ayant lieu dans seulement 0,3% (valeur maximale) des cellules. Cela signifie qu'une cellule sur 40 qui présentent un regroupement des DSB peut comporter des translocations. Il serait donc nécessaire de comprendre quelle est la balance bénéfique/risque pour les cellules du regroupement des DSB dans le noyau.

D'autre part, les protéines majeurs de la NHEJ sont impliquées dans la formation des translocations chez l'homme (Ghezraoui et al., 2014). Cela est surprenant puisque les DSB qui se regroupent sont principalement les DSB réparées préférentiellement par HR. De plus, DNA-PK, protéine de la NHEJ, semble au contraire inhiber la formation de translocations (Roukos et al., 2013). Il reste encore à éclaircir le mécanisme exact de formation des translocations et l'étude du regroupement des DSB devrait ainsi nous permettre de mieux comprendre la biogénèse des translocations.

nucleo-skeleton
(nuclear F-actin, nuclear MTs)
mediated clustering

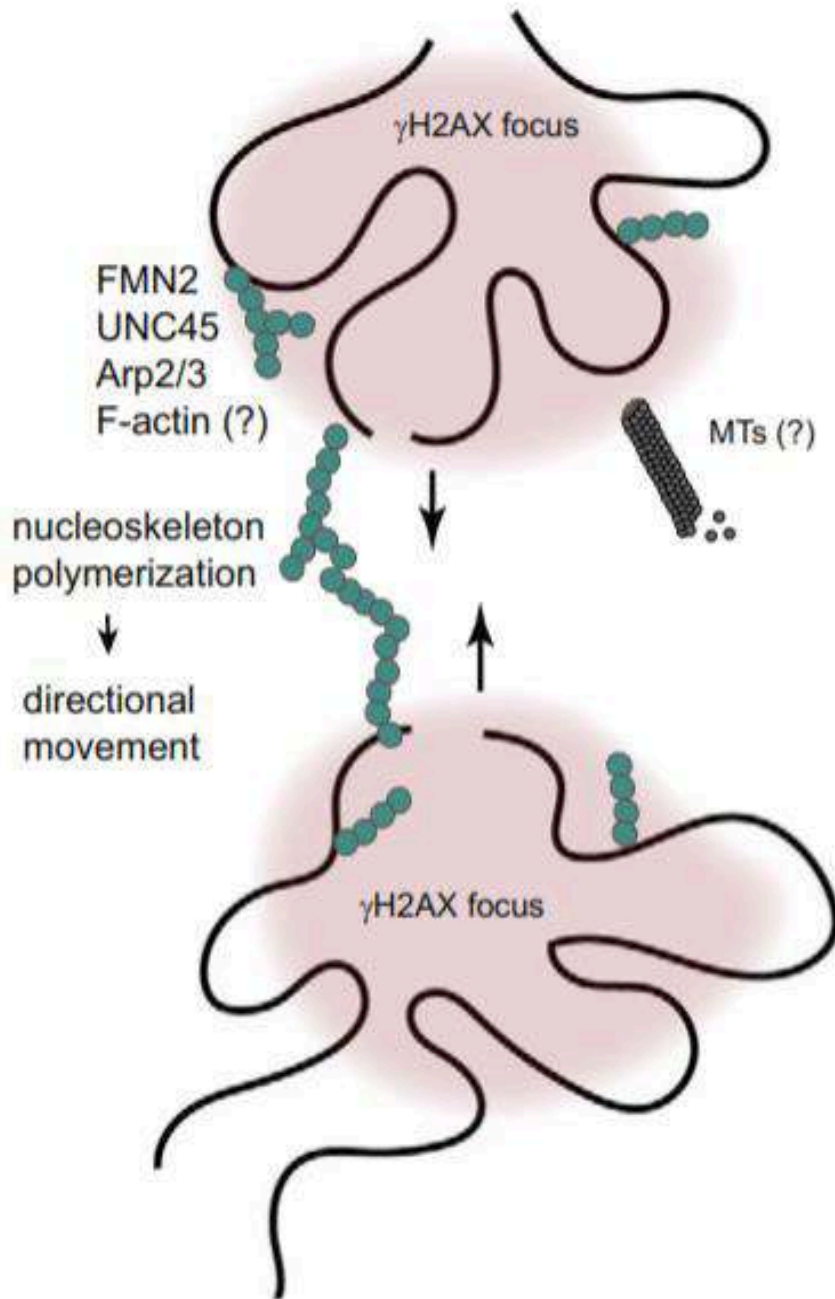


Figure 26: Rôle potentiel du cytosquelette dans le regroupement des DSB.

Le regroupement des DSB dépend du squelette nucléaire (actine polymérisée en filaments ou non, microtubules (MT)) (d'après Arnould and Legube, 2020). Le mécanisme mis en jeu est encore inconnu mais s'il dépend des protéines du squelette cellulaire, qui consomment de l'ATP, il pourrait s'agir d'un mécanisme de mobilité active.

C. Une mobilité active ?

De façon intéressante, les DSB induites dans des régions télomériques sont non seulement capables de se regrouper, mais ce phénomène de regroupement est directionnel (Cho et al., 2014). Un mouvement directionnel indique que la DSB parcourt une distance plus grande sur une durée donnée qu'une région d'ADN qui se déplace par simple diffusion. Si ce mécanisme est bien directionnel, il se pourrait qu'il implique des protéines du réseau du cytosquelette, acteur principal de l'architecture cellulaire et de la mobilité directionnelle et active des protéines et des structures au sein de la cellule. En effet, ces protéines sont capables de transformer l'énergie chimique de la cellule (ATP) en énergie mécanique (mouvement). Plusieurs études ont ainsi étudié le rôle des protéines du squelette cellulaire et/ou nucléaire dans la mobilité et le regroupement des DSB (Figure 26).

C1. Réseau d'actine

Le réseau d'actine est un composant majeur du cytosquelette. L'actine peut exister sous forme polymérisée et filamenteuse ou non polymérisée et globulaire. Le réseau d'actine est impliqué par exemple dans le maintien de la forme de la cellule ou la mobilité cellulaire. Initialement identifiée comme n'étant présente que dans le cytoplasme, beaucoup d'études récentes ont pu identifier en plus faible quantité de l'actine dans le noyau, sous forme polymérisée ou non (Kelpsich and Tootle, 2018).

A l'aide d'une sonde ciblant spécifiquement l'actine nucléaire, il a été mis en évidence que, suite à l'induction de DSB par un agent génotoxique, l'actine peut se polymériser dans le noyau sous forme de filaments (Belin et al., 2015). De plus, la protéine responsable de la polymérisation de l'actine en réponse aux dommages à l'ADN est la Formin2, protéine connue comme étant un organisateur de l'actine et qui est de plus surexprimée et phosphorylée en réponse aux dommages à l'ADN. De façon intéressante, la Formin2 est impliquée dans le regroupement des DSB qui a lieu en G1, suggérant que la polymérisation de l'actine nucléaire en filaments pourrait favoriser le regroupement des DSB en G1 (Aymard et al., 2017). D'autre part, le contact entre chromosomes homologues observé en G0/G1 après induction de DSB dans un autre type cellulaire dépend de la polymérisation de l'actine et de la myosine nucléaire I, protéine motrice ATP-dépendante permettant l'allongement ou le rétrécissement des filaments d'actine en les faisant coulisser les uns par rapport aux autres (Evdokimova et al., 2018). Il reste cependant à comprendre si le contact entre chromosomes homologues et le

INTRODUCTION

regroupement des DSB en G1 sont un seul et même phénomène ou des phénomènes distincts.

D'autre part, le regroupement des DSB, qui a lieu en G2 et qui promeut la réparation par HR, dépend également de l'actine nucléaire (Schrank et al., 2018). En effet, à l'aide d'un anticorps ciblant l'actine nucléaire spécifiquement, les auteurs ont pu observer la formation de foyers d'actine nucléaire co-localisant avec les foyers Rad51. De façon intéressante, ces foyers d'actine nucléaire sont établis par le complexe de polymérisation de l'actine Arp2/3 et l'activateur de la polymérisation WASP. Le regroupement des DSB en G2 ainsi que la réparation par HR sont ainsi favorisés par la polymérisation de l'actine nucléaire. Cependant, il ne semble pas que ce soit la polymérisation d'actine en filaments qui joue un rôle dans ce contexte. Il est à noter que, d'après ces études, le complexe ARP2/3 n'est pas impliqué dans la mobilité des DSB en G1 et à l'inverse, la Formin 2 n'est pas impliquée dans la mobilité des DSB en G2. Cela suggère l'existence de mécanismes conduisant au regroupement des DSB différents entre la G1 (filaments-dépendante ?) et la G2 (polymérisation en foyers ?).

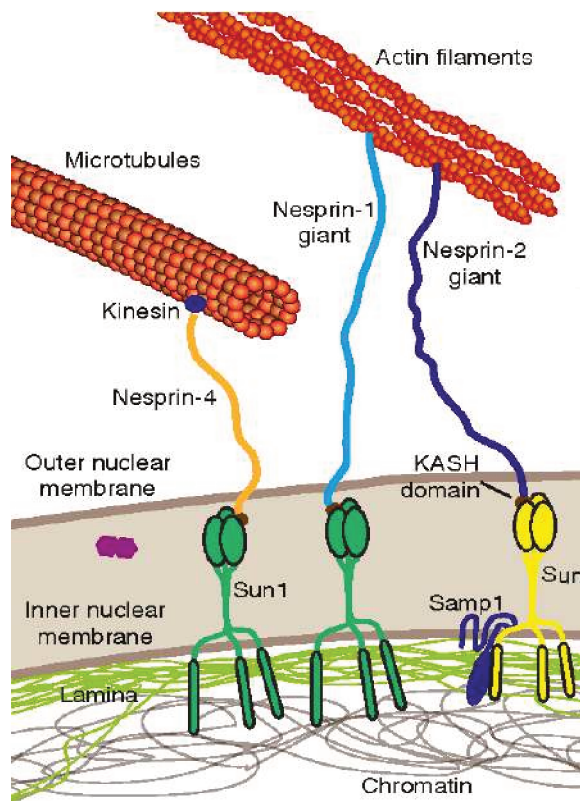
Enfin, chez la drosophile la formation de filaments d'actine est exercée grâce au complexe Arp2/3 et permet la relocalisation dépendante de la myosine des DSB hétérochromatiniennes à la périphérie nucléaire pour faciliter leur réparation par HR (Caridi et al., 2018).

C2. La tubuline

La tubuline est également un élément clé du squelette cellulaire. Elle peut être polymérisée sous forme de microtubule ou dépolymérisée. Les microtubules sont par exemple responsables du transport d'éléments à travers la cellule et de la ségrégation des chromosomes en mitose. De façon intéressante, chez les mammifères comme chez la levure, les microtubules sont nécessaires à la mobilité des DSB (Lottersberger et al., 2015; Lawrimore et al., 2017; Oshidari et al., 2020). D'ailleurs, un traitement de taxol, drogue qui stabilise les microtubules, affecte la mobilité des DSB chez la souris, indiquant un rôle positif des microtubules sur la mobilité des DSB (Lottersberger et al., 2015).

Bien que des microtubules n'aient pas encore été visualisés dans le noyau chez les mammifères en réponse aux DSB, la kinésine Kif2C, protéine impliquée dans la dépolymérisation des microtubules, est impliquée dans la mobilité et la réparation des DSB chez l'homme (Zhu et al., 2020). Cette protéine est recrutée aux DSB grâce à ATM et PARP1, où elle promeut la mobilité des DSB ainsi que leur regroupement et leur réparation par HR et

a



b

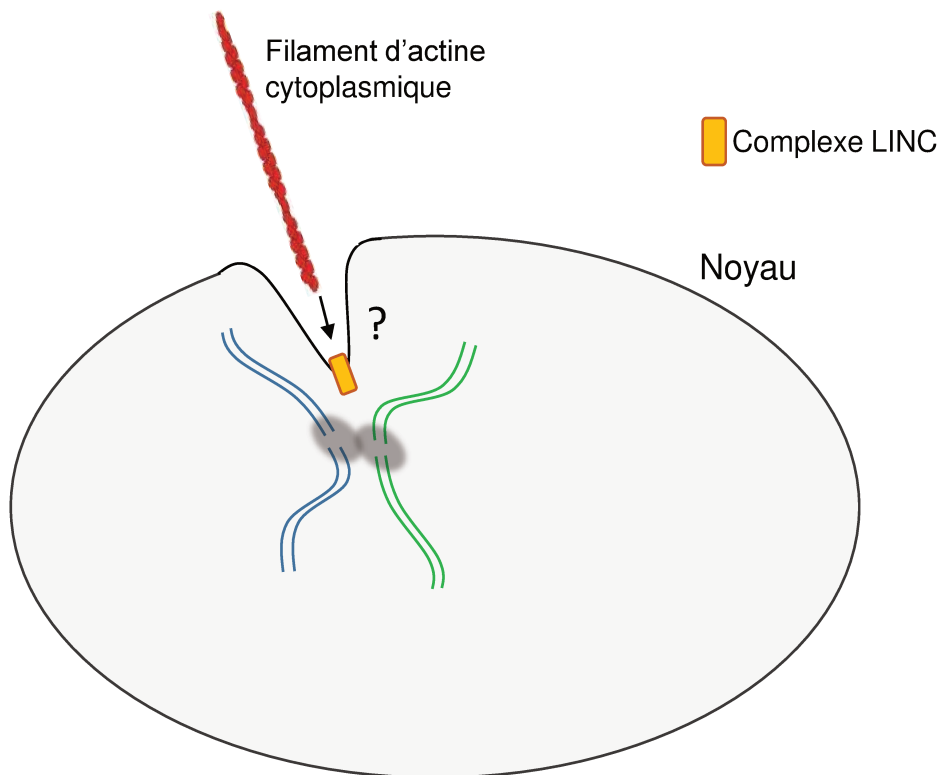


Figure 27: Rôle potentiel du complexe LINC dans la mobilité des DSB:

(a) Structure du complexe LINC (Linker of the the Nucleoskeleton and the Cytoskeleton) (d'après Isermann et al., 2013). **(b)** Le cytosquelette (filaments d'actine ou microtubules) pourrait exercer une force sur la membrane nucléaire, transmise à la chromatine endommagée par le complexe LINC. Cela pourrait conduire, via un mécanisme inconnu, au regroupement des DSB.

INTRODUCTION

NHEJ. Il serait nécessaire de comprendre si Kif2C réalise ceci grâce à un effet sur des microtubules nucléaires.

C3. Le complexe LINC

Le complexe LINC (Linker of the Nucleoskeleton and the Cytoskeleton) est situé dans la membrane nucléaire et permet de connecter le cytosquelette au squelette nucléaire et ainsi de transmettre les forces exercées par le cytosquelette (microtubules et filaments d'actine) à la chromatine (Figure 27a). Il permet également de positionner le noyau au sein de la cellule. Il est composé de protéines se situant dans la membrane nucléaire interne (protéines SUN), qui interagissent avec le squelette nucléaire (lamina nucléaire), et de protéines se situant dans la membrane nucléaire externe (protéines Nesprin), qui ont un domaine KASH, qui leur permet d'interagir avec le cytosquelette. Les Nesprin et les SUN interagissent ensemble dans l'espace périnucléaire.

De façon intéressante, chez la levure et chez la drosophile, la relocalisation des DSB à la membrane nucléaire dépend de protéines de la famille des SUN (Oza et al., 2009; Ryu et al., 2015).

Il existe deux types de protéines SUN chez les mammifères : SUN1 et SUN2. Or, il a été montré chez la souris que les protéines SUN1 et SUN2 sont nécessaires à la mobilité des DSB induites par irradiations (Lottersberger et al., 2015). De plus, chez l'homme, SUN2 est importante pour le regroupement des DSB en G1 (Aymard et al., 2017). Cependant le mécanisme reste peu compris et ne semble pas dépendre d'une relocalisation des DSB à la membrane nucléaire.

Enfin, la protéine SUN1 permet la relocalisation des DSB nucléolaires à la périphérie du nucléole (Marnef et al., 2019). Il a ainsi été proposé que SUN1, localisé à la membrane nucléaire, permettrait de réaliser des invaginations de la membrane nucléaire pour que la membrane nucléaire soit en contact avec le nucléole, facilitant ainsi la relocalisation des DSB nucléolaires. Un mécanisme similaire d'invagination de la membrane nucléaire contenant le complexe LINC, mais avec la protéine SUN2, pourrait être mis en place pour favoriser le regroupement des DSB qui sont induites en dehors du nucléole. Si cette hypothèse s'avère exacte, il sera nécessaire de comprendre si les invaginations sont créées grâce à des réseaux d'actine ou de microtubules nucléaires, ou si elles sont formées par des forces exercées par le squelette cytoplasmique sur la membrane nucléaire (Figure 27b).

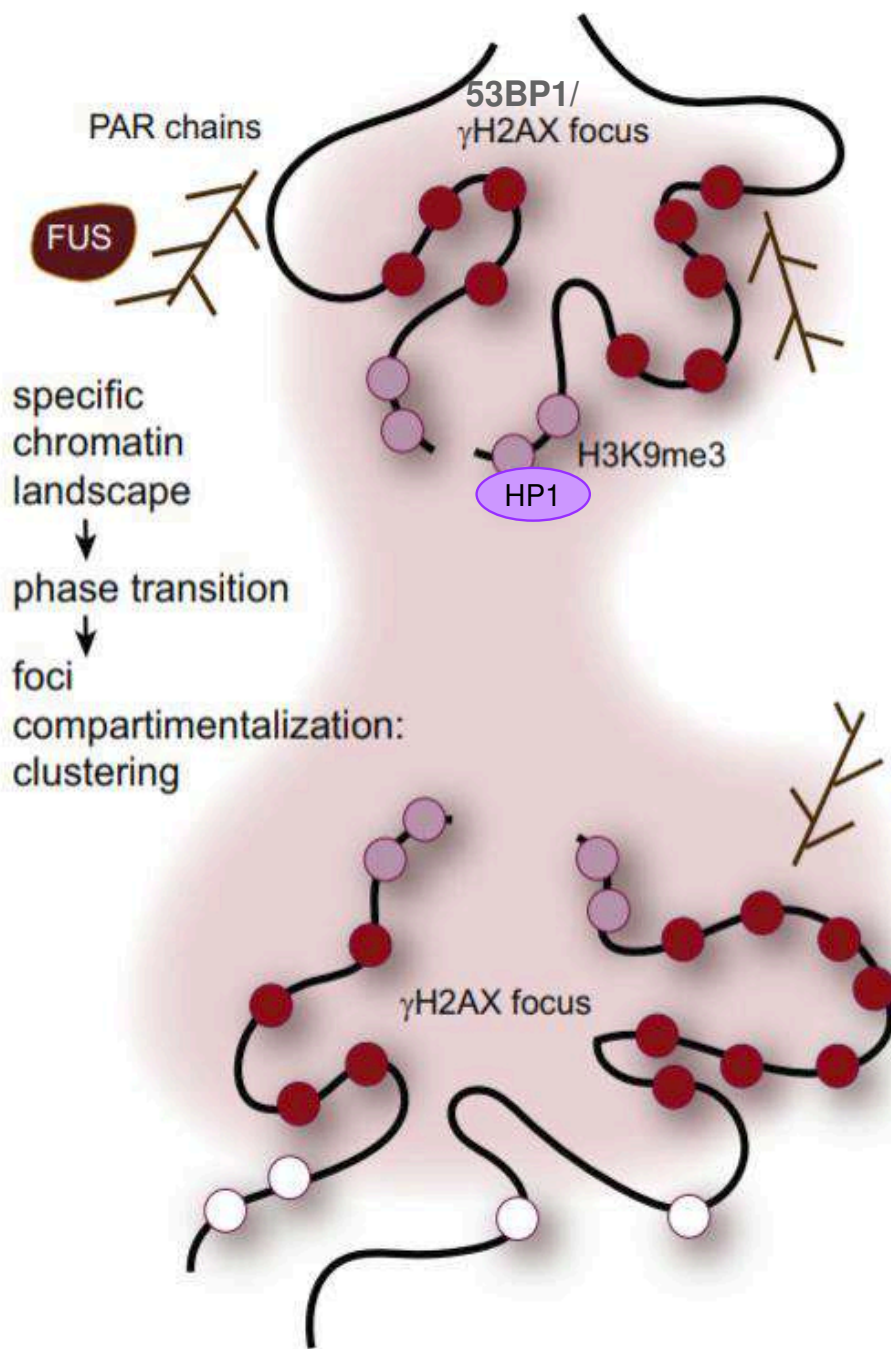


Figure 28: Rôle potentiel de la séparation de phase dans le regroupement des DSB.

Les DSB pourraient se regrouper grâce à un phénomène de séparation de phase (d'après Arnould and Legube, 2020). Les protéines recrutées aux DSB telles que 53BP1, HP1 et FUS exercent de la séparation de phase. Il est donc possible qu'elles participent au regroupement des DSB en réalisant de la séparation de phase.

D. Une mobilité passive ?

Une mobilité des DSB pourrait également être expliquée par un phénomène de séparation de phase liquide-liquide. Comme expliqué dans le Chapitre I, des modifications chromatiniennes et/ou le recrutement de protéines de réparation particulières non-miscibles avec le reste du nucléoplasme, pourraient permettre de former un/des compartiment(s) spécifique(s) dans le noyau contenant les différentes DSB aux propriétés similaires.

En accord avec cette hypothèse, 53BP1 possède des caractéristiques de protéine guidant la séparation de phase en s'associant avec elle-même et en formant des gouttelettes dans le noyau (Kilic et al., 2019). 53BP1 peut donc former des compartiments isolés du reste du noyau par de la séparation de phase, qui se regroupent et se dissocient de façon très dynamique. Ainsi, le regroupement des DSB peut être dû à de la séparation de phase liquide-liquide. Il a d'ailleurs été montré que 53BP1 est important pour la mobilité des DSB (Lottersberger et al., 2015). D'autre part, la force des interactions entre DSB, mesurée par Capture Hi-C est proportionnelle aux niveaux de γ H2AX, donc probablement de 53BP1, qui est recruté sur les domaines γ H2AX (Aymard et al., 2017). Enfin, 53BP1 étant beaucoup plus recruté à la chromatine en G1, cela pourrait expliquer le regroupement de DSB qui a lieu durant cette phase du cycle cellulaire (Figure 28) (Aymard et al., 2017; Clouaire et al., 2018).

D'autre part, il a été proposé que les foyers de réparation puissent former des compartiments dans le noyau grâce à de la séparation de phase exercée par la parylation, qui a lieu au niveau des DSB, ainsi que par la protéine FUS, recrutée aux DBS grâce à la parylation (Altmeyer et al., 2015; Patel et al., 2015; Singatulina et al., 2019).

De plus, HP1 est une protéine hétérochromatinienne recrutée sur les domaines H3K9me3, qui a été impliquée dans la formation de l'hétérochromatine par séparation de phase (Larson et al., 2017; Strom et al., 2017). Or, HP1 et le complexe Polycomb 1, qui a également des propriétés de séparation de phase sont recrutés aux DSB (Chou et al., 2010; Luijsterburg et al., 2009; Plys et al., 2019). Il serait donc possible que HP1 et/ou Polycomb exercent également un rôle dans le regroupement des DSB par séparation de phase.

Enfin, il a été proposé que la relocalisation des DSB hors du nucléole pourrait dépendre de la séparation de phase. En effet, le nucléole semble être formé grâce à des évènements de séparation de phase et la transcription semble avoir un rôle essentiel dans la structuration du nucléole. En effet, l'inhibition de la transcription qui a lieu suite à l'induction de DSB dans le nucléole conduit à la fusion de différents compartiments du nucléole puis à leur relocalisation

INTRODUCTION

à l'extérieur du nucléole. Les auteurs proposent donc que l'inhibition de la transcription pourrait conduire à la formation de nucleolar caps par séparation de phase (Mooser et al., 2020).

En conclusion, la séparation de phase semble être importante pour le regroupement des DSB, au même titre que les protéines du squelette cellulaire. Il reste à comprendre comment réconcilier un mode de regroupement des DSB actif (mouvement potentiellement directionnel) et un mécanisme passif (mouvement diffusif).

Tandis que nos connaissances sur les fonctions de la chromatine dans la réponse aux dommages à l'ADN se sont récemment développées, le rôle de la conformation 3D de la chromatine en *cis* et à l'échelle du noyau dans la réparation de l'ADN reste encore mal compris.

Plus précisément, tandis que des études proposent un lien entre les TAD et les foyers de réparation, il serait important de comprendre si les TAD sont impliqués dans la formation des larges foyers de réparation couverts par γ H2AX et si oui, comment.

De plus, le regroupement des DSB pouvant potentiellement conduire à l'apparition de translocations, souvent à l'origine de cancers, il est d'une grande importance de comprendre précisément pourquoi ce phénomène s'exerce. Afin de comprendre la fonction de du regroupement des DSB, il est important d'identifier quand cet événement se produit majoritairement (phase du cycle), entre quelles portions d'ADN (les DSB seules ou de larges domaines entiers), ainsi que tous les acteurs impliqués dans ce phénomène. Enfin il est également nécessaire de confirmer le rôle du regroupement des DSB dans la formation de translocations.

Enfin, les cohésines étant impliquées dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes en *cis* des DSB (maintien ou répression selon les cas), il reste à comprendre les mécanismes mis en jeu dans ce processus dépendant des cohésines.

La question se pose alors de quel est le rôle de la conformation de la chromatine dans la réparation des DSB et comment celle-ci est impactée par l'apparition de DSB dans le génome ?

RÉSULTATS

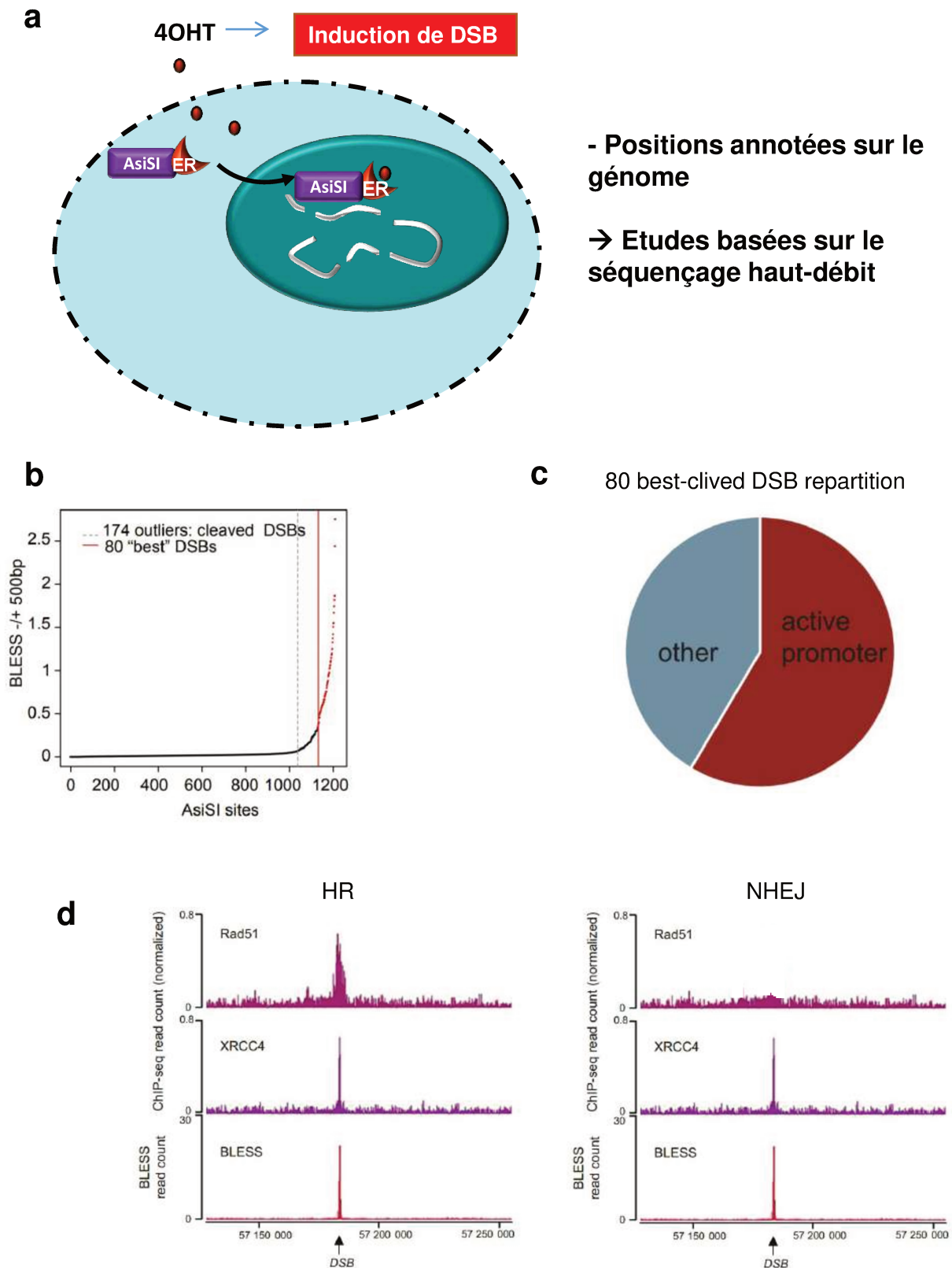


Figure 29: Le système DivA (DSB Inducible via AsiSI).

(a) En absence de traitement, l'enzyme de restriction AsiSI est localisée dans le cytoplasme. Un traitement de 4-Hydroxy-Tamoxifen (4OHT), qui est un ligand du récepteur aux œstrogènes modifié (ER), entraîne une relocalisation de l'enzyme dans le noyau, où elle clive des sites spécifiques et annotés du génome. (b) Les 80 DSB les mieux induites du système DivA ont été déterminées grâce à leur niveau de BLESS, technique mesurant la quantité de clivage à l'échelle du génome entier (Clouaire et al., 2018). (c) Plus de la moitié des 80 DSB les mieux induites sont situées dans des promoteurs actifs (Clouaire et al., 2018). Le reste est situé dans le corps des gènes, dans des promoteurs inactifs ou dans des régions intergéniques. (d) Les 30 DSB préférentiellement réparés par HR ou par NHEJ ont été déterminés grâce à leur enrichissement ou non en Rad51 par ChIP-seq. Le niveau de Rad51 est normalisé par rapport à l'efficacité de clivage de chaque DSB (estimé par rapport à la quantité de signal XRCC4 ou de BLESS) (Arnould et al., 2021, voir Annexes).

Avant-propos

L'ensemble des expériences présentes dans les travaux suivants a été réalisé dans la lignée cellulaire DivA (DSB Inducible via AsiSI). Cette lignée cellulaire a été développée dans le laboratoire de Gaëlle Legube et correspond à des cellules humaines U2OS, modifiées pour exprimer l'enzyme de restriction AsiSI, fusionnée à une version modifiée du récepteur aux œstrogènes (ER), qui ne lie que le 4-Hydroxy-Tamoxifen (4OHT) (Iacovoni et al., 2010).

En absence de traitement, l'enzyme de restriction est localisée dans le cytoplasme. En revanche, un traitement de 4 heures de 4OHT, ligand du ER, entraîne une relocalisation de l'enzyme dans le noyau, où elle clive des sites spécifiques et annotés du génome (Figure 29a). Puisque la position des DSB est connue, cet outil possède l'avantage considérable de pouvoir étudier les processus liés à la réparation avec par exemple, l'utilisation de techniques basées sur le séquençage à haut-débit. La technique de BLESS (Breaks Labeling, Enrichment on Streptavidin and next-generation Sequencing), technique permettant de précipiter et de séquencer toutes les DSB du génome, a été réalisée dans le système DivA avant après induction de DSB et a permis d'identifier les 80 DSB les mieux induites du génome sur les 1211 sites AsiSI prédits (Figure 29b) (Clouaire et al., 2018). Les sites AsiSI clivés possèdent un biais de répartition vers les promoteurs actifs (Figure 29c). Les autres sites AsiSI clivés sont situés dans les promoteurs inactifs, les corps de gènes et dans les régions intergéniques.

Enfin, 30 DSB réparées préférentiellement par HR et 30 DSB réparées préférentiellement par NHEJ ont été déterminées parmi les 80 DSB les mieux induites. Pour cela, le niveau de Rad51 a été mesuré sur chaque DSB et normalisé par rapport à l'efficacité de clivage (déterminée par BLESS ou grâce au niveau de XRCC4 en ChIP-seq) (Figure 29d) (Arnould et al., 2021; Clouaire et al., 2018). Les 30 DSB possédant le meilleur enrichissement en Rad51 sont considérées comme les DSB réparées préférentiellement par HR tandis que les 30 DSB possédant le moins de Rad51, mais possédant un fort niveau de XRCC4 sont considérées comme les DSB réparées préférentiellement par NHEJ.

I. La formation des foyers de réparation autour des cassures double-brin de l'ADN dépend du mécanisme de « loop extrusion »

La réparation des cassures double-brin de l'ADN (DSB) est essentielle pour préserver l'intégrité du génome. Suite à l'apparition de DSB dans le génome, la kinase ATM établit rapidement un domaine de chromatine de l'ordre du mégabase couvert par γ H2AX afin de former un foyer de réparation. Comment ces foyers de réparation sont formés si loin de la DSB n'est pas encore bien compris. De façon importante, le génome est organisé en trois dimensions dans le noyau. Les TAD (Topologically Associating Domains) correspondent à une unité clé de cette organisation de la chromatine et ont été impliqués dans des processus tels que la transcription ou la réplication. Pourtant le rôle des TAD et de leurs mécanismes de formation dans la réparation n'est pas encore connu. Certaines observations suggèrent un lien entre les TAD et la réparation puisqu'il a été rapporté que les cohésines sont recrutées aux DSB et que les frontières des TAD corrélaient avec les frontières des foyers de réparation (Caron et al., 2012; Kim et al., 2002; Unal et al., 2004).

Dans cette étude nous avons étudié le rôle des TAD et des cohésines dans l'établissement des foyers de réparation couverts par γ H2AX ainsi que les mécanismes mis en jeu. Pour cela nous avons réalisé des études à haute-résolution et à grande échelle à l'aide de techniques telles que le Hi-C, le 4C-seq et la ChIP-seq dans le système DivA.

Nous avons démontré que les TAD sont des unités fonctionnelles de la réparation puisqu'ils délimitent la propagation de γ H2AX. Nous avons également mis en évidence un processus de « loop extrusion » unidirectionnel dépendant des cohésines, mis en place de part et d'autre de chaque DSB afin qu'ATM phosphoryle H2AX sur un TAD entier de façon très rapide. Nous avons également mis en évidence un rôle d'ATM dans ce processus de loop extrusion DSB-dépendant, qui pourrait dépendre de son rôle dans le recrutement des cohésines aux DSB. Enfin, nous avons montré que le recrutement des cohésines est renforcé à l'intérieur des TAD endommagés, potentiellement dans le but de renforcer le processus de loop extrusion, et que ce renforcement pourrait être dépendant de leur phosphorylation par ATM.

1 **Loop extrusion as a mechanism for DNA Double-Strand Breaks repair foci**
2 **formation**

3

4 Coline Arnould¹, Vincent Rocher¹, Anne-Laure Finoux¹, Thomas Clouaire¹, Kevin Li², Felix
5 Zhou², Pierre Caron¹, Philippe. E. Mangeot³, Emiliano. P. Ricci⁴, Raphael Mourad¹, James E
6 Haber², Daan Noordermeer⁵ and Gaëlle Legube^{1*}

7

8 ¹*LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative (CBI), CNRS, Université de Toulouse, UT3*

9 ²*Rosenstiel Basic Medical Sciences Research Center and Department of Biology, Brandeis*
10 *University, Waltham, MA 02454-9110*

11 ³*CIRI – International Center for Infectiology Research, Inserm, U1111, Université Claude*
12 *Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007,*
13 *Lyon, France.*

14 ⁴*Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule, Université de Lyon, INSERM U1210,*
15 *CNRS UMR 5239, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, F-*
16 *69007 Lyon, France.*

17 ⁵*Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-*
18 *sur-Yvette, France*

19 * corresponding author: gaelle.legube@univ-tlse3.fr

20 **Running Title:** DSB-anchored cohesin loop extrusion mediates γ H2AX spreading

21 **Keywords:** Cohesin, Loop extrusion, DNA Double-Strand Breaks, γ H2AX, DNA Damage
22 Response, Topologically Associated Domains.

23 **DNA Double-Strand Break (DSB) repair is essential to safeguard genome integrity. Upon**
24 **DSBs, the ATM PI3K kinase rapidly triggers the establishment of megabase-sized,**
25 **γ H2AX-decorated chromatin domains which further act as seeds for the formation of**
26 **DNA Damage Response (DDR) foci¹. How these foci are rapidly assembled in order to**
27 **establish a “repair-prone” environment within the nucleus is yet unclear. Topologically**
28 **Associating Domains (TADs) are a key feature of 3D genome organization that**
29 **compartmentalize transcription and replication, but little is known about their**
30 **contribution to DNA repair processes^{2,3}. Here we found that TADs are functional units of**
31 **the DDR, instrumental for the correct establishment of γ H2AX/53BP1 chromatin domains**
32 **in a manner that involves one-sided cohesin-mediated loop extrusion on both sides of the**
33 **DSB. We propose a model whereby H2AX-containing nucleosomes are rapidly**
34 **phosphorylated as they actively pass by DSB-anchored cohesin. Our work highlights the**
35 **critical impact of chromosome conformation in the maintenance of genome integrity and**
36 **provides the first example of a chromatin modification established by loop extrusion.**

37

38 DNA double-strand breaks induce the formation of DDR foci, which are microscopically
39 visible and characterized by specific chromatin modifications (γ H2AX, ubiquitin accumulation,
40 histone H1 depletion) and the accumulation of DDR factors (53BP1, MDC1)⁴⁻⁶. Previous
41 evidence indicated that chromosome architecture may control γ H2AX spreading. Indeed,
42 γ H2AX domain boundaries were found in some instances to coincide with TAD boundaries⁷.
43 Moreover, super-resolution light microscopy revealed that CTCF, which binds at TAD
44 boundaries and thereby constrains the loop-extruding activity of the Cohesin complex that
45 shapes these domains in undamaged cells, is juxtaposed to γ H2AX foci⁸. In addition, 53BP1
46 can form nanodomains which frequently overlap with a TAD, as detected by DNA-FISH⁹.

47 High-resolution ChIP-seq mapping following the induction of multiple DSB at annotated
48 positions (using human DlvA cells)¹⁰ revealed that the spreading of these DDR foci components
49 on nearby chromatin follows a highly stereotyped pattern (one example shown in Fig 1a)⁵. We
50 hypothesized that such patterns could be governed by pre-existing high-order chromatin
51 structure established prior to DSB induction. To relate the spreading of DDR foci components
52 with chromosome conformation, we performed high-resolution 4C-seq experiments in
53 undamaged human DlvA cells. As viewpoints we selected three genomic locations that are
54 damaged in DlvA cells following activation of the AsiSI restriction enzyme as well as one
55 undamaged control region. The chromatin conformation around these three viewpoints in
56 normal (undamaged) condition was remarkably similar to the distribution of γ H2AX
57 determined post DSB induction (Fig. 1a-b, Extended Data Fig. 1a), suggesting that initial
58 chromosome architecture dictates γ H2AX spreading and downstream events such as
59 accumulation of MDC1, ubiquitin and 53BP1 following DSB. To prove that DDR domains do
60 not spread into neighboring self-interacting domains, we focused on an AsiSI-induced DSB
61 located on chr1, for which spreading of DDR foci components is profoundly asymmetrical (Fig.
62 1c, red signal). 4C-seq performed at two independent viewpoints separated by 470 kb revealed
63 the existence of two adjacent self-interacting domains with a boundary corresponding to the
64 abrupt drop in γ H2AX (Fig. 1c, blue signal, TAD boundary is indicated by the dotted line). This
65 strongly suggests that pre-existing chromatin domains, established before any damage occurs,
66 constrain the spread of DDR foci. To generalize this finding, we performed Hi-C and CTCF
67 ChIP-seq in undamaged DlvA cells (Extended Data Fig 1b-d). Strikingly, computed
68 Topologically Associating Domains (TADs) borders and CTCF-bound genomic loci coincided
69 with a sharp decrease in γ H2AX signals (Fig. 1d-e, Extended Data Fig. 1e). In agreement,
70 γ H2AX, MDC1 and 53BP1 were significantly more enriched within the damaged TADs
71 compared to neighboring TADs (Extended Data Fig. 1f), although spreading through

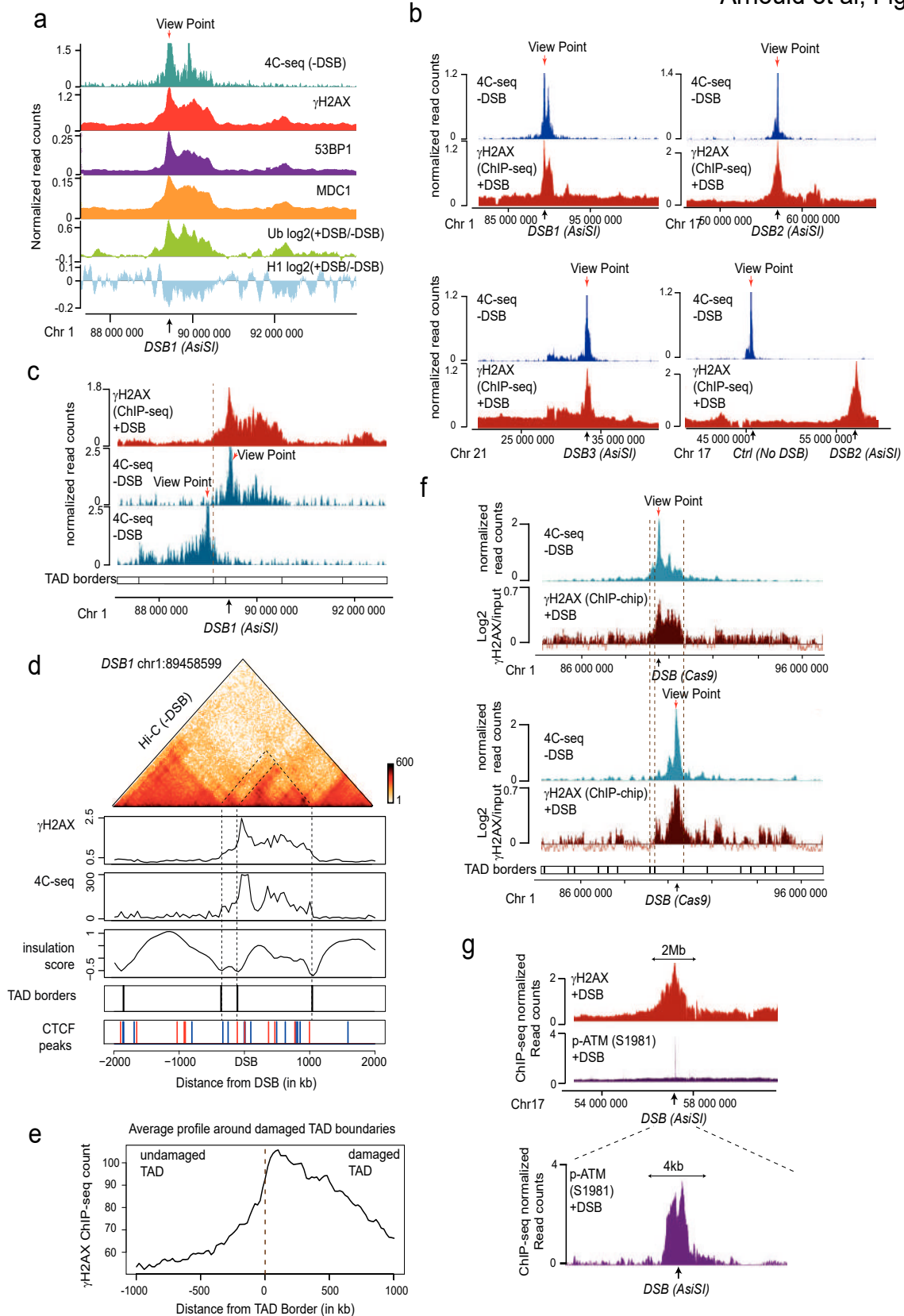
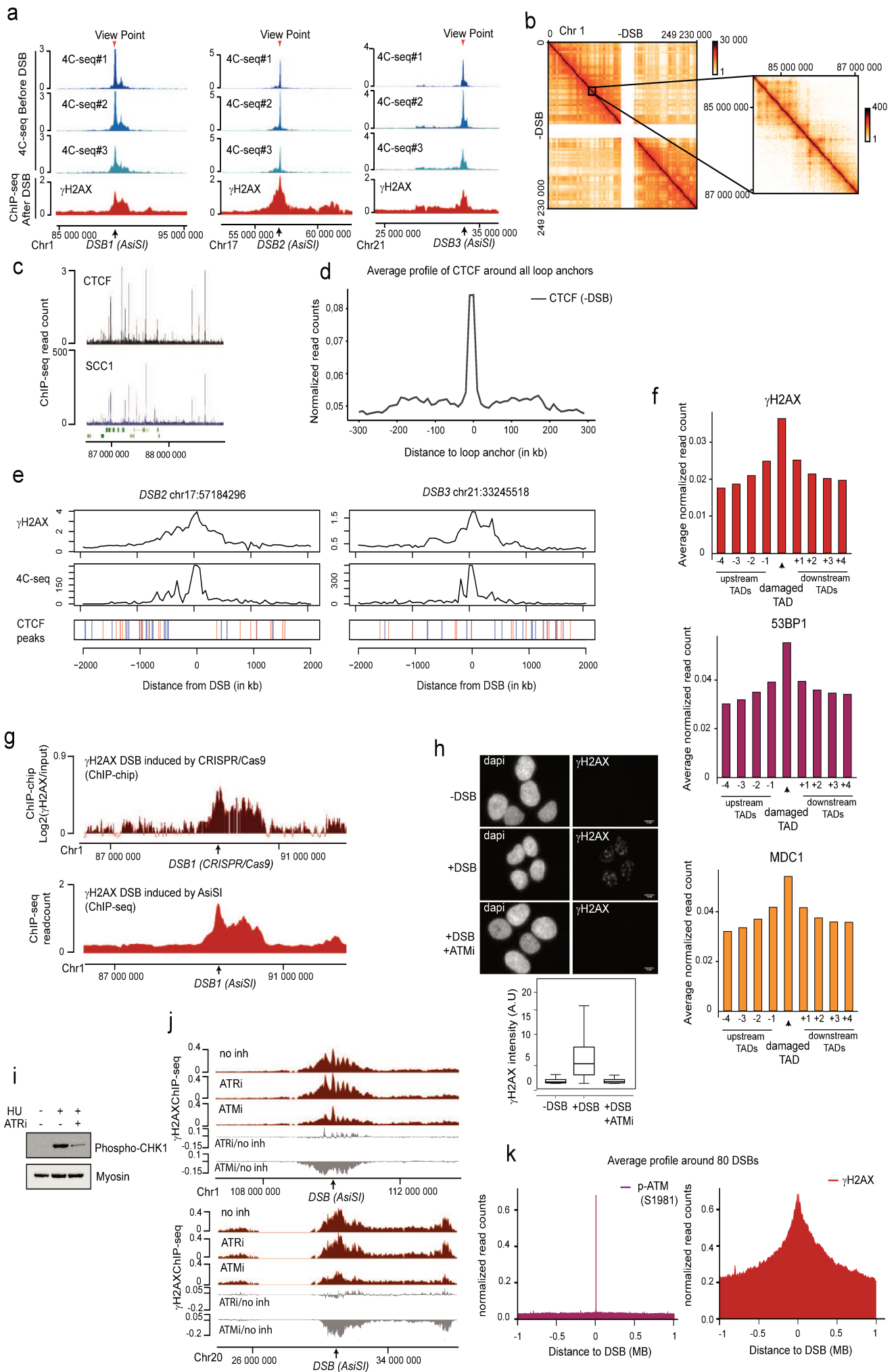


Figure 1. TADs are functional units governing DDR chromatin domains establishment

(a) Genome browser screenshot representing the 4C-seq signal in undamaged cells (-DSB), the histone H1 (H1.2) and Ubiquitin (FK2) ChIP-seq log₂ ratio in damaged versus undamaged condition (+DSB/-DSB) and the γ H2AX, MDC1 and 53BP1 ChIP-seq signals after DSB induction (+DSB) as indicated. ChIP-seq data are smoothed using 50kb span, 4C-seq using a 10kb span. The AsiSI site is indicated by an arrow. (b) Genome browser screenshots representing the 4C-seq signal before DSB induction (-DSB) and the γ H2AX ChIP-seq signal after DSB induction (+DSB) for different viewpoints localized at three AsiSI sites or a Control region. One representative experiment is shown. ChIP-seq and 4C-seq data are smoothed using a 50kb span. The AsiSI sites are indicated by arrows. (c) Genome browser screenshot representing the γ H2AX ChIP-seq signal after DSB induction (+DSB) and the 4C-seq signal before DSB induction (-DSB) for two viewpoints localized at the AsiSI site or 470 kb upstream of the AsiSI site. Viewpoints are indicated by red arrows, the DSB by a black arrow. ChIP-seq and 4C-seq data are smoothed using 10 kb span. (d) Hi-C contact matrix of a region of the chromosome 1 in DivA cells before DSB induction (top panel). γ H2AX ChIP-seq after DSB induction, 4C-seq signal, TAD borders computed from HiC data and CTCF ChIP-seq peak position before DSB induction are shown (Peaks in blue contain a CTCF motif in the forward orientation and peaks in red a CTCF motif in the reverse orientation). (e) Average profile of γ H2AX ChIP-seq after DSB induction centered on the closest TAD border to the 174 best-induced DSBs (damaged TAD on the right). (f) Genome browser screenshots representing the 4C-seq signal (smoothed using a 10 kb span) before DSB induction (-DSB) (in blue) using view points as indicated (red arrows). γ H2AX ChIP-chip (log₂ sample/input, smoothed using 500 probes span) after DSB induction with CRISPR/Cas9 (black arrows) are shown in red. (g) Genome browser screenshot representing γ H2AX and p-ATM (S1981) ChIP-seq signals after DSB induction (+DSB) on an 8 Mb window (top panel) and a 15 kb window (bottom panel) around an AsiSI site (black arrow).



Extended Data Figure 1. Related to figure 1

(a) Genome browser screenshots representing the 4C-seq signal before DSB induction (-DSB) obtained for three independent biological replicates and the γ H2AX ChIP-seq signal after DSB induction for different viewpoints localized at three AsiSI sites or a Control region. ChIP-seq data are smoothed using 100 kb span, 4C-seq using a 50 kb span. The AsiSI sites are indicated by arrows. **(b)** Example of the Hi-C pattern obtained on chromosome 1 at a 500kb resolution (left) together with a magnification at a 10kb resolution (right). **(c)** Genome browser screenshot representing the CTCF and the calibrated-SCC1 ChIP-seq signals. **(d)** Average profile representing the CTCF ChIP-seq signal around the loop anchors of the whole genome, validating both CTCF ChIP-seq and HiC datasets. **(e)** γ H2AX ChIP-seq after DSB induction, 4C-seq signal, CTCF ChIP-seq peak position before DSB induction are shown (Peaks in blue contain a CTCF motif in the forward orientation and peaks in red a CTCF motif in the reverse orientation). **(f)** ChIP-seq signal for γ H2AX (left), 53BP1 (middle) and MDC1 (right) was computed within the damaged TAD and neighboring TADs for the 174 best cleaved DSBs in DlvA cells. **(g)** Genome browser screenshot of the chromosome 1 showing the γ H2AX distribution around a DSB induced by CRISPR/Cas9 (upper panel, ChIP-chip, expressed as the \log_2 sample/input) and by AsiSI at the same position (lower panel, ChIP-seq). **(h)** Top: Immunofluorescence experiment showing γ H2AX and DAPI staining before and after DSB induction with or without ATM inhibitor as indicated. Bottom: Quantification of γ H2AX intensity (expressed in A.U: Arbitrary Unit) in the above conditions. One representative experiment is shown. **(i)** Validation of the ATR inhibitor efficiency: Western Blot showing the effect of ATRi on the phosphorylation of CHK1 following a treatment with hydroxyurea (HU). **(j)** Genome browser screenshot representing the γ H2AX ChIP-seq signal after DSB induction in untreated cells or in cells treated with an inhibitor of ATM or ATR at two DSB sites and smoothed with a 20kb span. The differential γ H2AX signal obtained after DSB induction (expressed as the \log_2 ratio ATMi/untreated or ATRi/untreated, grey tracks) is also shown. **(k)** Average profile of p-ATM (S1981) (left panel) and γ H2AX (right panel) ChIP-seq on a 2 Mb window around the eighty best-cleaved DSBs in DlvA cells.

72 boundaries was observed to some extent, in agreement with the rather moderate insulation
73 properties of these domains and boundaries¹¹.

74 To further investigate if TADs dictate γ H2AX spreading, we used the CRISPR/Cas9 system to
75 induce a single DSB at two designed positions within the same TAD, and investigated both
76 chromosome conformation and γ H2AX distribution. Cas9-induced DSB recapitulated the
77 γ H2AX spreading observed when inducing a DSB at the same genomic location by AsiSI
78 (Extended Data Fig. 1g), thus confirming that γ H2AX spreading is independent of the DSB
79 induction method. Moving the DSB to a further downstream position in the TAD triggered a
80 change in the γ H2AX profile that was notably similar to the 3D interaction pattern of this
81 genomic region, yet it remained constrained within the same TAD (Fig. 1f). Altogether these
82 data indicate that mechanisms governing the spatial organization of chromosomes into self-
83 interacting domains facilitates and demarcates the formation of γ H2AX domains. Given that
84 γ H2AX is seeding further signaling events leading to the stable assembly of DDR foci and full
85 checkpoint activation, this indicates that genome organization within TADs is critical for the
86 response to DNA damage.

87 In human cells, ATM is the main DDR kinase that catalyzes H2AX phosphorylation upon DSB
88 detection¹² (Extended Data 1h-j). In order to gain more insights into the mechanism that
89 mediates γ H2AX establishment on entire self-interacting domains, we further profiled ATM.
90 Activated ATM (autophosphorylated on S1981) binding was restricted to the immediate
91 vicinity of the DSB (< 5kb) in sharp contrast with the pattern observed for γ H2AX (see Fig. 1g
92 for one example and Extended Data Fig. 1k for the average profiles around the eighty best-
93 induced DSBs). This indicates that H2AX phosphorylation is not mediated by the linear
94 spreading of the kinase on entire TADs.

95

96 The organisation of the genome into TADs is driven by activity of cohesin^{13,14}, a ring-shaped
97 protein complex, which was initially identified for its essential role in sister chromatid cohesion.
98 Of importance, strong evidence support a role of cohesin in the maintenance of genome
99 integrity^{15,16} and cohesin accumulates at sites of damage, which may be in line with a role in
100 sister chromatid cohesion during Homologous Recombination (HR) in S/G2¹⁷⁻²³. Yet, cohesin
101 enrichment has been identified at DSBs throughout the cell cycle as well, which argues against
102 an exclusive role for cohesin in HR^{7,16}. In order to get insights in the cohesin binding status at
103 DSBs at high resolution, we performed calibrated ChIP-seq profiling of the SCC1 cohesin
104 subunit, in both undamaged and damaged conditions. Notably, cohesin was enriched at sites of
105 damage spanning 2-5kb around the DSB (Fig. 2a) leading to the formation of peaks at DSB
106 sites nearly as high as pre-existing cohesin peaks at CTCF binding sites (Extended Data Fig.
107 2a-b), and in a manner that depends on the cohesin loader NIPBL, on ATM activity and on the
108 MRN complex subunit MRE11 (Extended Data Fig. 2c).

109 Cohesin has been proposed to structure TADs by an active, ATP-dependent, loop extrusion
110 mechanism²⁴⁻²⁸. In this model, once loaded onto chromatin, cohesin leads to the formation and
111 processive enlargement of DNA loops. The formation of these loops is eventually arrested at
112 boundary elements, of which a large fraction is bound by the CTCF insulator protein. Increased
113 cohesin around DSBs could thus indicate ongoing loop extrusion at site of damage. We hence
114 set to analyze 3D genome organization by Hi-C before and after DSB induction in DlvA cells,
115 focusing on *cis* interaction frequencies around DSBs. Differential (+DSB/-DSB) aggregate Hi-
116 C maps were further computed around DSBs and around TAD borders as a control (Extended
117 data Fig. 2d). Interestingly, a unique pattern of “stripes” appears at both sides of the DSBs
118 following DSB induction, in two independent Hi-C biological replicates (Fig. 2b, white arrows,
119 Extended Data Fig. 2e). Stripes were previously reported as the characteristic of one-sided loop
120 extrusion, where localized cohesin loading allows a locus to act as a loop anchor with increased

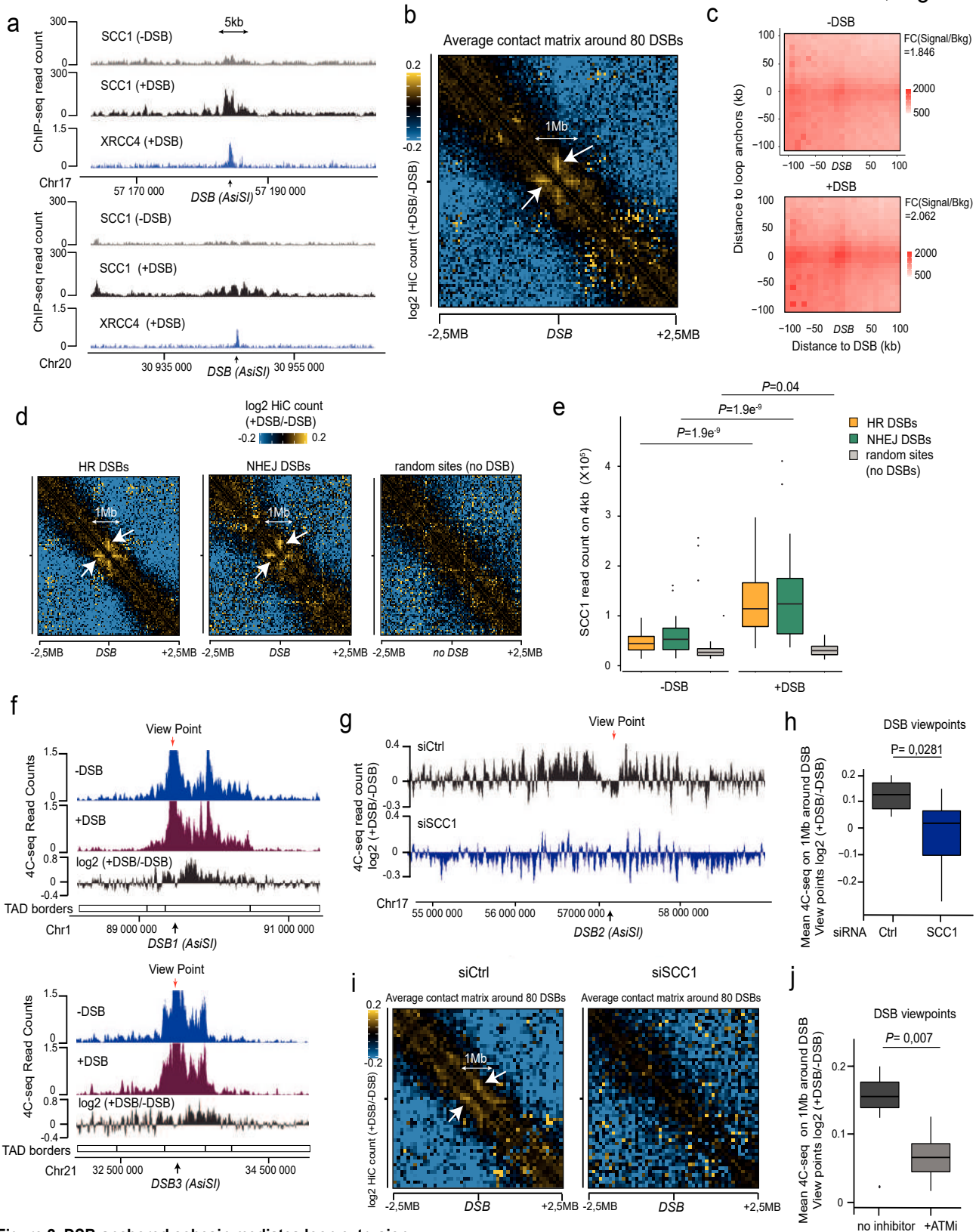
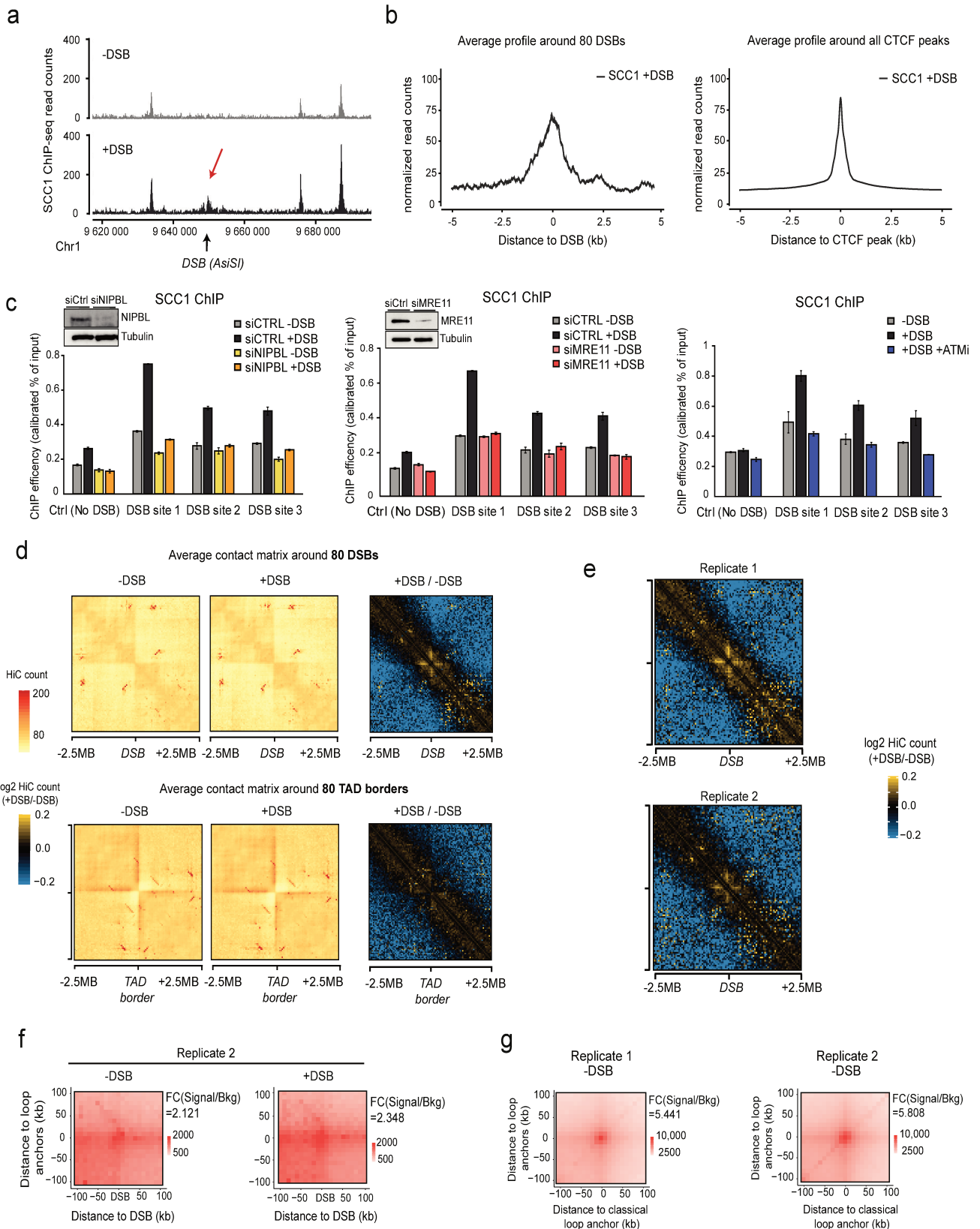
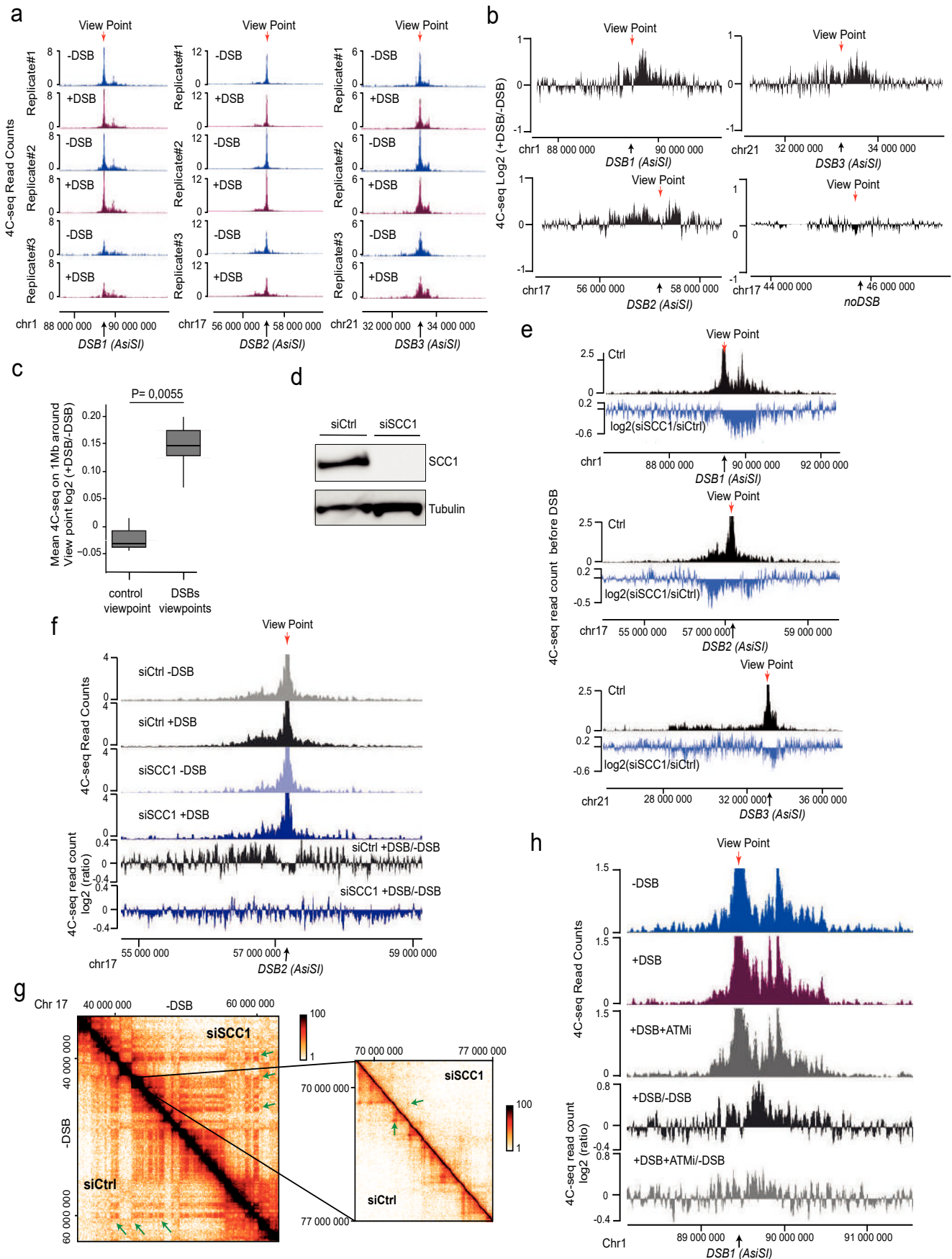


Figure 2. DSB-anchored cohesin mediates loop extrusion.

(a) Genome browser screenshots representing the calibrated SCC1 ChIP-seq before (-DSB) and after DSB induction (+DSB). XRCC4 (an NHEJ component) ChIP-seq after DSB induction (+DSB) is also shown. DSB are indicated by black arrows. (b) Averaged Hi-C contact matrix representing the log₂ ratio between damaged versus undamaged cells (from 2 biological replicates) centered on the eighty best-induced DSBs (50 kb resolution on a 5 Mb window). Stripes are indicated by white arrows. (c) Mean aggregate Peak Analysis (APA) plot on a 200kb window (10 kb resolution) before (-DSB) and after DSB induction (+DSB), calculated between the DSBs and loops anchors (n=525 pairs). The fold change between the signal (central pixel) and the background (upper left corner 5x5 pixels) is indicated. (d) Averaged Hi-C contact matrix representing the log₂ ratio between damaged versus undamaged cells (from 2 biological replicates) around 30 DSBs found as repaired by HR (left panel), or 30 DSBs found as repaired by NHEJ (mid panel), as well as around 30 random undamaged sites (right panel), using a 50 kb resolution on a 5 Mb window. (e) Boxplots representing the SCC1 ChIP-seq enrichment before and after DSB induction as indicated, on 4 kb around DSBs repaired by HR (yellow) or by NHEJ (green). Values for random undamaged sites (grey) are also shown. P values are indicated (paired two-sided Wilcoxon test). (f) Genome browser screenshots representing the 4C-seq signals on a ~3 Mb window (smoothed using a 10 kb span) before (blue) and after (purple) DSB induction as indicated using two independent DSB viewpoints. Differential 4C-seq (Log₂ +DSB/-DSB) is also indicated (black). One representative experiment is shown. (g) Genome browser screenshot representing differential 4C-seq signal (Log₂ +DSB/-DSB, 10 kb smoothed) in control siRNA condition (black) or in SCC1 siRNA condition (blue). (h) Differential 4C-seq signal (Log₂ +DSB/-DSB) was computed on 1 Mb around four DSBs viewpoints (two independent biological experiments) upon control or SCC1 depletion by siRNA as indicated. P value between control and SCC1 siRNA is indicated (two-sided Wilcoxon test). (i) Averaged Hi-C contact matrix representing the log₂ ratio between damaged versus undamaged cells in CTRL or SCC1 depleted conditions, centered on the eighty best-induced DSBs (100 kb resolution on a 5 Mb window). Stripes are indicated by white arrows. (j) Boxplot representing cis interactions computed as in (h) for four DSBs viewpoints (three biological experiments) in control condition or upon ATM inhibition as indicated. P value between control and ATM inhibited cells is indicated (two-sided Wilcoxon test).


Extended Data Figure 2. Related to figure 2

(a) Genome browser screenshot representing SCC1 calibrated ChIP-seq before (-DSB) and after DSB induction (+DSB). SCC1 enrichment at DSB site is indicated by a red arrow. (b) Average profile of SCC1 ChIP-seq signal centered on 80 best-induced DSBs (top panel) or centered on all CTCF peaks of the genome (bottom panel) on a 10 kb window. (c) Calibrated ChIP-qPCR of SCC1 in Ctrl or NIPBL or Mre11 depleted cells by siRNA, before (-DSB) or after DSB induction (+DSB) at three DSB sites or a control negative region. Western Blot validating the depletion of the proteins NIPBL and MRE11 by the corresponding siRNA. Calibrated ChIP-qPCR of SCC1 before (-DSB) or after DSB induction (+DSB) and after DSB induction upon ATM inhibition (+DSB+ATMi). SEM and mean for technical replicates are shown, from a representative experiment. (d) Averaged Hi-C contact matrix representing the signal before (-DSB) or after DSB induction (+DSB) (matrix observed/expected) or the log₂ ratio between damaged versus undamaged cells centered on the eighty best-induced DSBs (top panel) or centered on eighty TAD borders (bottom panel) (50 kb resolution on a 5 Mb window). (e) Averaged Hi-C contact matrix representing the log₂ ratio between damaged versus undamaged cells centered on the eighty best-induced DSBs in two independent biological replicates (50 kb resolution on a 5 Mb window). (f) Aggregate Peak Analysis (APA) plot on a 200kb window (10 kb resolution) before (-DSB) and after DSB induction (+DSB) in the biological replicate 2. APA are calculated between the DSBs and loops anchors (n=552 pairs). The fold change between the signal (central pixel) and the background (upper left corner 5x5 pixels) is indicated. (g) APA plot on a 200kb window (10 kb resolution) before DSB induction (-DSB) in two independent biological replicates. APA are calculated between classical loop anchors that are near DSB sites (<500kb) (n=674 pairs for replicate 1 and 737 pairs for replicate 2). The fold change between the signal (central pixel) and the background (upper left corner 5x5 pixels) is indicated.


Extended Data Figure 3. Related to figure 2

(a) Genome browser screenshots representing the 4C-seq signal (smoothed using a 10 kb span) before and after DSB induction as indicated, obtained for three biological replicates using viewpoints localized at three DSB sites. The DSBs are indicated by arrows. (b) Differential 4C-seq ($\log_2 +\text{DSB}/-\text{DSB}$) is shown for three viewpoints located at DSB sites (viewpoints 1 to 3) and on a Ctrl region (viewpoint 4). (c) Differential 4C-seq signal ($\log_2 +\text{DSB}/-\text{DSB}$) was computed on 1 Mb around four independent viewpoints located at DSBs ("DSBs viewpoints") and one control region ("Control viewpoint") and across four independent biological replicates. P value between control and DSBs viewpoints is indicated (two-sided Wilcoxon test). (d) Western Blot showing the depletion of SCC1 by siRNA. (e) Genome browser screenshots showing the differential (\log_2) 4C-seq signal in SCC1 siRNA treated cells versus control siRNA-treated cells (in undamaged conditions) for three viewpoints. (f) Genome browser screenshots showing the 4C-seq signals before and after DSB induction in siRNA Ctrl- or SCC1-treated cells and the differential 4C-seq signal in Ctrl or SCC1 siRNA treated cells ($\log_2 +\text{DSB}/-\text{DSB}$) (10kb smoothed). (g) Hi-C maps before DSB induction of a region of the chromosome 17 at a resolution of 100kb and a zoom at a resolution of 25kb in Ctrl- and SCC1-depleted cells. (h) Genome browser screenshots showing the 4C-seq signals before and after DSB induction in untreated or ATM inhibitor treated cells and the differential 4C-seq signal ($\log_2 +\text{DSB}/-\text{DSB}$ or $+\text{DSB}+\text{ATMi}/-\text{DSB}$) (10kb smoothed).

121 interaction with an entire neighboring domain^{27,29,30}. Indeed, our averaged Hi-C contact
122 matrixes around TAD borders revealed, as expected, similar stripes, but those were independent
123 of DSB induction (Extended Data Fig. 2d). We further performed Aggregate Plot Analysis
124 (APA) to assess looping between the DSB position and neighboring anchors. Notably, the APA
125 score increased following production of DSBs (Fig. 2c, Extended Data Fig. 2f) indicating that
126 the DSBs themselves display loop anchoring properties, although not reaching an anchoring
127 score as high as nearby pre-existing anchors (Extended Data Fig. 2g).

128 We previously determined which repair pathway (*i.e.* Homologous Recombination (HR) or Non
129 Homologous End Joining (NHEJ)) is preferentially utilized at different DSBs induced by AsiSI
130 in DlvA cells³¹. Importantly, an equivalent stripe pattern was observed at both DSBs repaired
131 by HR or those repaired by NHEJ (Fig. 2d). In agreement, SCC1 accumulates on a 4 kb window
132 around DSBs irrespective of the pathway used for repair (Fig. 2e). Altogether these data suggest
133 that cohesin accumulates at either side of a DSB, irrespective of the pathway used for repair, to
134 induce a divergent one-sided loop extrusion towards (and thus increased contacts with) the
135 surrounding regions on both sides of the break.

136 In order to further investigate DSB-anchored loop extrusion, we performed 4C-seq before and
137 after DSBs induction, using viewpoints located at the exact positions of three DSBs induced in
138 DlvA cells (same viewpoints as in Figure 1). Importantly, the overall TADs structure and
139 boundaries were well maintained post DSB induction (Extended Data Fig. 3a) indicating that
140 chromosome conformation within TAD is not completely reshuffled upon damage induction on
141 the genome. Yet, as expected from Hi-C data, we could detect increased interactions between
142 viewpoints and surrounding loci post-DSB (Fig. 2f, Extended Data Fig. 3b), which was not the
143 case when using a control undamaged sequence as a viewpoint (Extended Data Fig. 3b-c). If
144 DSB-anchored, cohesin-mediated loop extrusion is responsible for enhanced interaction
145 frequency of the DSB with neighboring sequences post DSB induction, such behavior should

146 be abolished following cohesin depletion. Indeed, 4C-seq experiments revealed that depletion
147 of SCC1 (Extended Data Fig. 3d) strongly impaired the overall increase in contacts between
148 the DSBs and its neighboring sequences in damaged TADs (Fig. 2g-h, Extended Data Fig. 3e-
149 f). We further performed Hi-C in damaged and undamaged conditions following depletion of
150 SCC1. As expected from previous studies^{14,32}, SCC1 depletion led to the dissolution of TADs
151 and loops and to a stronger compartmentalization (plaid pattern) on Hi-C maps (Extended Data
152 Fig. 3g). Notably, SCC1 depletion abolished the stripe pattern induced at DSBs following
153 damage (Fig. 2i). Given that ATM is involved in SCC1 recruitment at DSBs (Extended Data
154 Fig. 2c) we further assessed the consequences of pharmaceutical inhibition of the ATM kinase
155 activity on the interaction frequency post-DSB by 4C-seq. Notably, upon ATM inhibition the
156 ability of the DSB to engage contacts with proximal sequences within damaged TADs was
157 strongly reduced (Fig. 2j, Extended Data Fig. 3h) in agreement with defective SCC1 recruitment
158 at DSBs in these conditions.

159 Altogether these data indicate that the ability of the DSB to contact neighboring loci within the
160 damaged TAD is a proper DNA Damage Response and cannot solely be explained by the
161 physical disruption of the DNA. Importantly, it depends on ATM activity and on the cohesin
162 complex, in agreement with a DSB-anchored loop extrusion mechanism.

163

164 We further investigated whether cohesin-mediated loop extrusion that takes place at DSBs is
165 instrumental for γ H2AX deposition. In this scenario γ H2AX should spread linearly from the
166 DSB site across time. To achieve high synchronization of γ H2AX deposition within the cell
167 population, we induced DSBs (by OHT treatment) but concomitantly inhibited ATM activity
168 (using an ATM inhibitor) allowing to “poise” γ H2AX establishment. Relieving ATM inhibition
169 allowed for a fast and synchronous accumulation of γ H2AX (Extended Data Fig. 4a). With this

170 experimental set up we observed a linear and bidirectional spreading of γ H2AX from the DSBs
171 by ChIP-seq, which is in agreement with a loop-extrusion dependent mechanism ensuring
172 H2AX phosphorylation (Fig. 3a).

173 If cohesin-mediated loop extrusion contributes to DDR foci formation, cohesin depletion
174 should trigger consequences on γ H2AX establishment. We hence analyzed γ H2AX profiles in
175 SCC1 deficient cells. Both γ H2AX ChIP-chip⁷ and ChIP-seq showed altered γ H2AX spreading
176 in SCC1-deficient cells compared to SCC1-proficient cells (Fig. 3b, Extended Data Fig. 4b-c)
177 and in a manner that coincided with a loss of *cis* contacts upon cohesin depletion (Fig. 3b,
178 Extended Data Fig. 4b).

179 Cohesin are released from chromatin by the accessory WAPL and PDS5 factors. Consequently
180 their depletion trigger longer chromatin loops proposed to arise from a more processive
181 cohesin-mediated, loop extrusion^{32,33}. Notably, we observed extended spreading of γ H2AX in
182 WAPL-depleted cells (Fig. 3c, Extended Data Fig 4d-e) in agreement with a contribution of
183 loop extrusion in γ H2AX deposition. Of note, this was also accompanied by a decreased level
184 of γ H2AX within TAD (Extended Data Fig. 4e). Given that WAPL depletion, while enlarging
185 loops, also decreases intra-TAD chromatin interaction³³, this suggests that intra-TAD
186 chromosome dynamics also contributes to γ H2AX full deposition.

187 To investigate if such a cohesin-dependant mechanism could account for the establishment of
188 DDR foci in budding yeast, we depleted PDS5 thanks to an auxin-inducible system in a *S.*
189 *cerevisiae* strain³⁴ that carries three HO endonuclease cleavage sites³⁵. Consistent with our
190 observations in human WAPL-depleted cells, extended spreading of γ H2A in yeast occurred
191 following depletion of PDS5 (Fig. 3d). Notably, PDS5 deficiency triggered decreased γ H2A
192 levels adjacent to the DSBs (Extended Data Fig. 4f), similarly to WAPL depletion in human
193 cells.

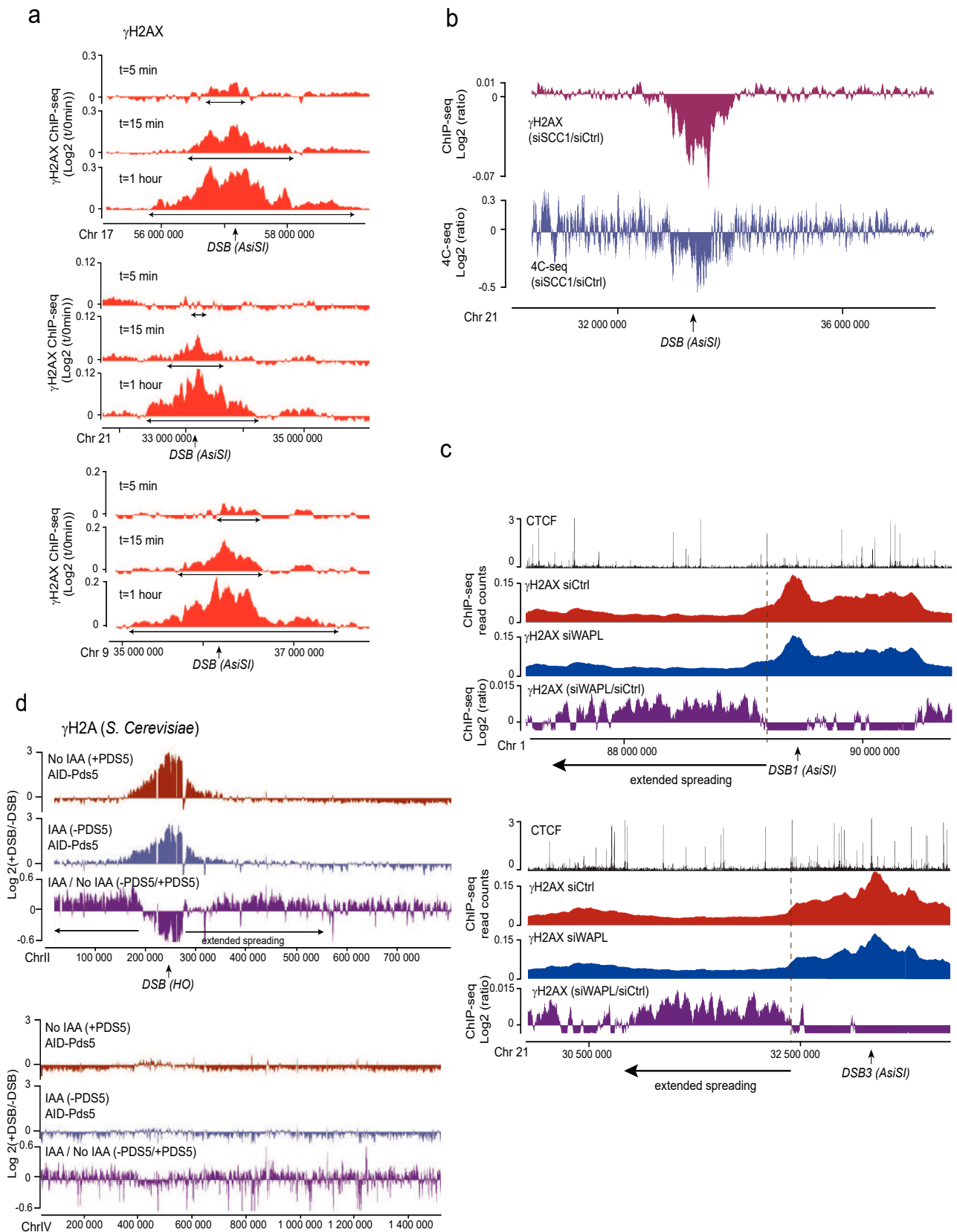
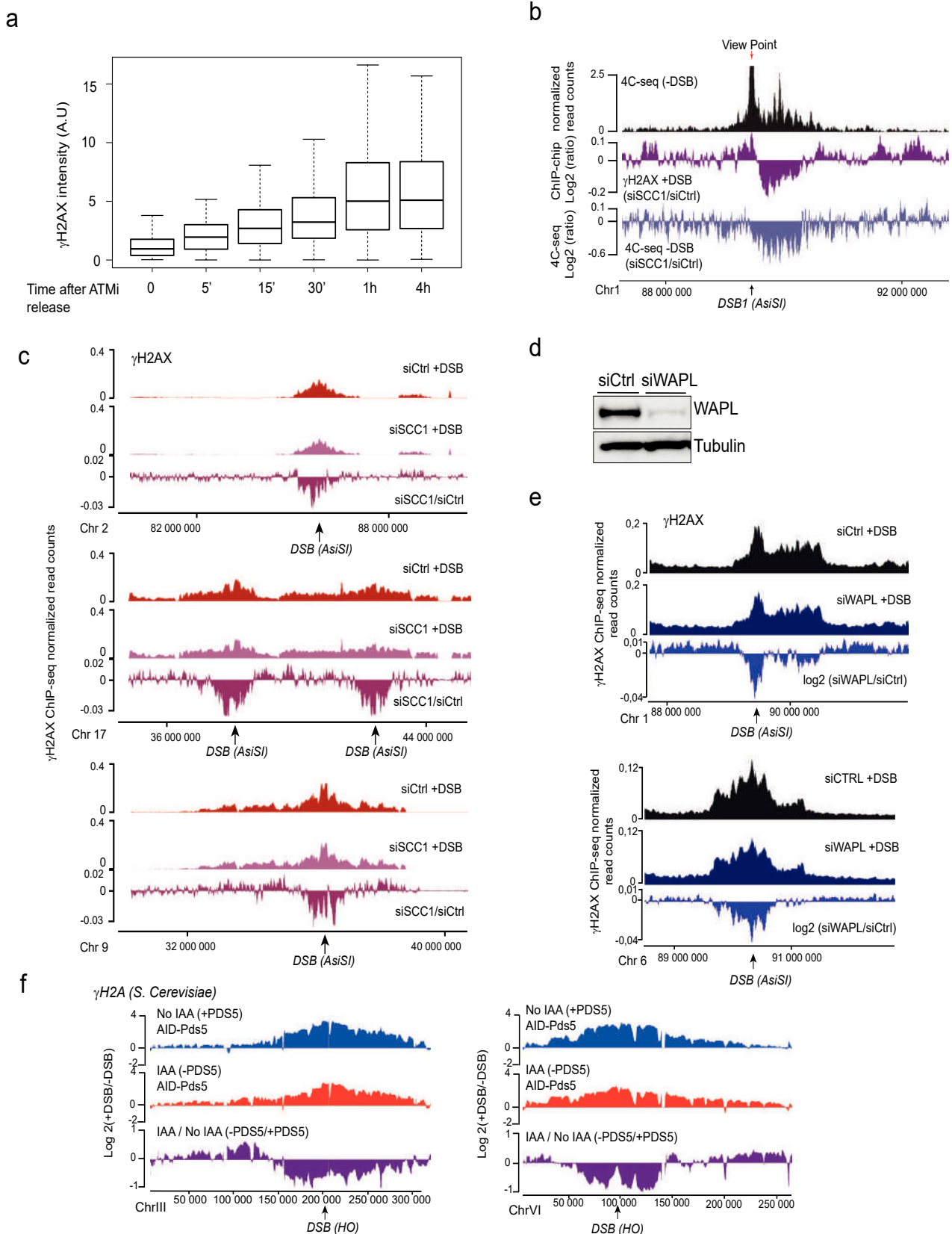


Figure 3. DSB-anchored loop extrusion mediates γ H2AX spreading.

(a) Genome browser screenshot representing the γ H2AX ChIP-seq signal at three DSB sites upon DSB induction at different time points after ATMi washes (log₂ +DSB+ATMi+time after washes / +DSB+ATMi+0min after washes), smoothed on a 20 kb span. (b) Genome browser screenshot representing the differential γ H2AX signal obtained after DSB induction by ChIP-seq in SCC1-depleted versus control cells (expressed as the γ H2AX log₂ ratio siSCC1/ siCtrl) (purple track), smoothed on a 20kb span. Light blue track shows the differential 4C-seq signal obtained in SCC1-depleted versus control cells before DSB induction (log₂ siSCC1/ siCtrl). (c) Genome browser screenshot representing the CTCF signal before DSB induction, the γ H2AX ChIP-seq signal after DSB induction in Ctrl or WAPL depleted cells and the differential γ H2AX signal obtained after DSB induction (expressed as the log₂ ratio siWAPL/siCtrl, 20kb smoothed) at two DSB sites (d) Genome browser screenshots representing the differential γ H2A ChIP-seq signal (log₂ +DSB/-DSB) before (no IAA) or after PDS5 degradation (IAA) at one DSB site (HO site)(top panel) and in a control region (without DSB)(bottom panel) in *S. Cerevisiae* PDS5-AID. The differential signal between after and before PDS5 degradation (IAA / No IAA) is also shown (purple). Data are smoothed on a 2kb span.


Extended Data Figure 4. Related to figure 3

(a) Quantification of γ H2AX intensity (expressed in A.U: Arbitrary Unit) after DSB induction upon ATM inhibition and at different time points after ATM release. One representative experiment is shown. (b) Genome browser screenshot representing 4C-seq before DSB induction using a DSB viewpoint (DSB is indicated by a black arrow, Viewpoint by a red arrow). Purple (middle) track represents the differential γ H2AX signal obtained after DSB induction by ChIP-chip in SCC1-depleted versus control cells (expressed as the γ H2AX \log_2 ratio siSCC1/ siCtrl). Light blue track (bottom track) shows the differential 4C-seq signal obtained in SCC1-depleted versus control cells before DSB induction (\log_2 siSCC1/ siCtrl). (c) Genome browser screenshot representing the γ H2AX ChIP-seq signal after DSB induction in Ctrl or SCC1 depleted cells and the differential γ H2AX signal obtained after DSB induction (expressed as the \log_2 ratio siSCC1/siCtrl) at two DSB sites. (d) Western blot validating the effect of the siRNA targeting WAPL on the WAPL protein level. (e) Genome browser screenshot representing the γ H2AX ChIP-seq signal after DSB induction in Ctrl or WAPL depleted cells and the differential γ H2AX signal obtained after DSB induction (expressed as the \log_2 ratio siWAPL/siCtrl) at two DSB sites and smoothed on a 20kb span. (f) Genome browser screenshot representing the differential γ H2A ChIP-seq signal (\log_2 +DSB/-DSB) before (no IAA) or after PDS5 degradation (IAA) at two DSB sites (HO sites) in *S. cerevisiae*.

194 Taken together these data suggest that cohesin accumulation at DSBs initiate a one-sided loop
195 extrusion process at either side of the break that establishes the phosphorylation of H2AX,
196 which will spread until loop extrusion reaches a strong boundary element (*i.e.* a TAD border).
197 Interestingly, this cohesin-dependant mechanism which ensures the rapid formation of DDR
198 foci is conserved from yeast to human.

199

200 We then set to address if the increased presence of cohesin at DSBs would impact the genomic
201 overall distribution of this protein complex following break induction. Previous work indicated
202 a genome-wide increase of cohesin, and reinforcement of TADs following exposure to
203 irradiation^{36,37}. In agreement, we found that SCC1 enrichment was increased at cohesin-binding
204 sites post-break induction, coinciding with an increased loop strength (Fig. 4a, top panel,
205 compare black and grey arrows, Fig. 4b). Of interest, DSB-induced SCC1 accrual at loop
206 anchors was seen within undamaged TADs but was more pronounced within damaged TADs
207 (Fig. 4c, Extended Data Fig. 5a) and the extent of SCC1 accumulation following DSBs at loop
208 anchors, depended on the distance from the DSB (Extended Data Fig. 5b). In agreement, Hi-C
209 data showed an increased loop strength upon DSB (Fig. 4 a) that decreased with distance to
210 DSB (Extended Data Fig. 5c). In agreement, Aggregate Peak Analysis indicated that the
211 strength of chromatin loops was significantly enhanced post DSB induction, in a manner
212 slightly more pronounced within TADs that experienced a DSB compared to undamaged TADs
213 (Fig. 4d, Extended Data Fig. 5d-e). Thus, our data indicate a generalized increase in SCC1
214 occupancy and loop strength throughout the genome after DSB production in a manner that is
215 weakly exacerbated within the TADs subjected to DSB.

216 The SMC1 and SMC3 cohesin subunits have been previously reported to be phosphorylated by
217 ATM following DSBs induction³⁸ and these modifications are essential for cohesin

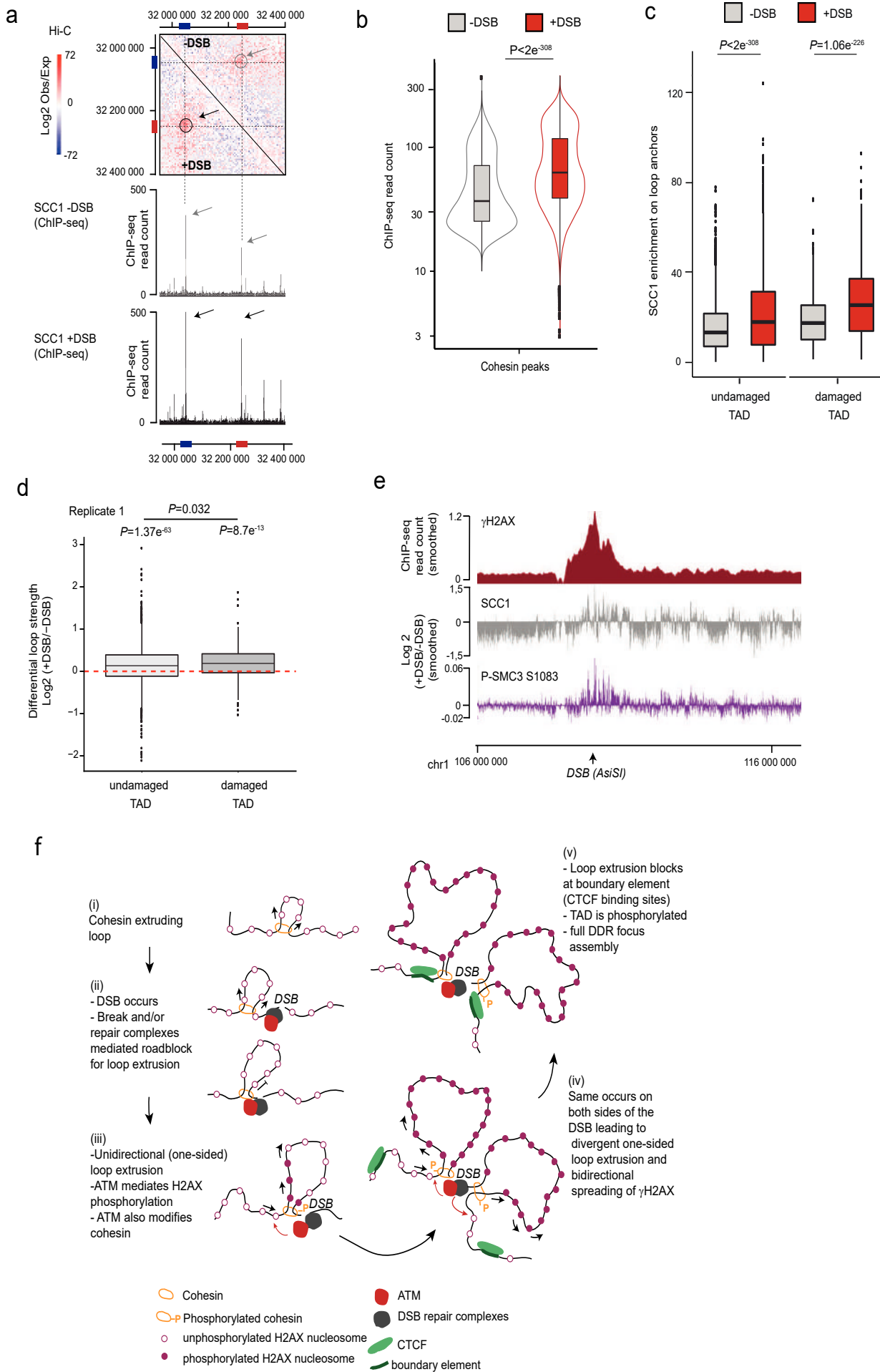
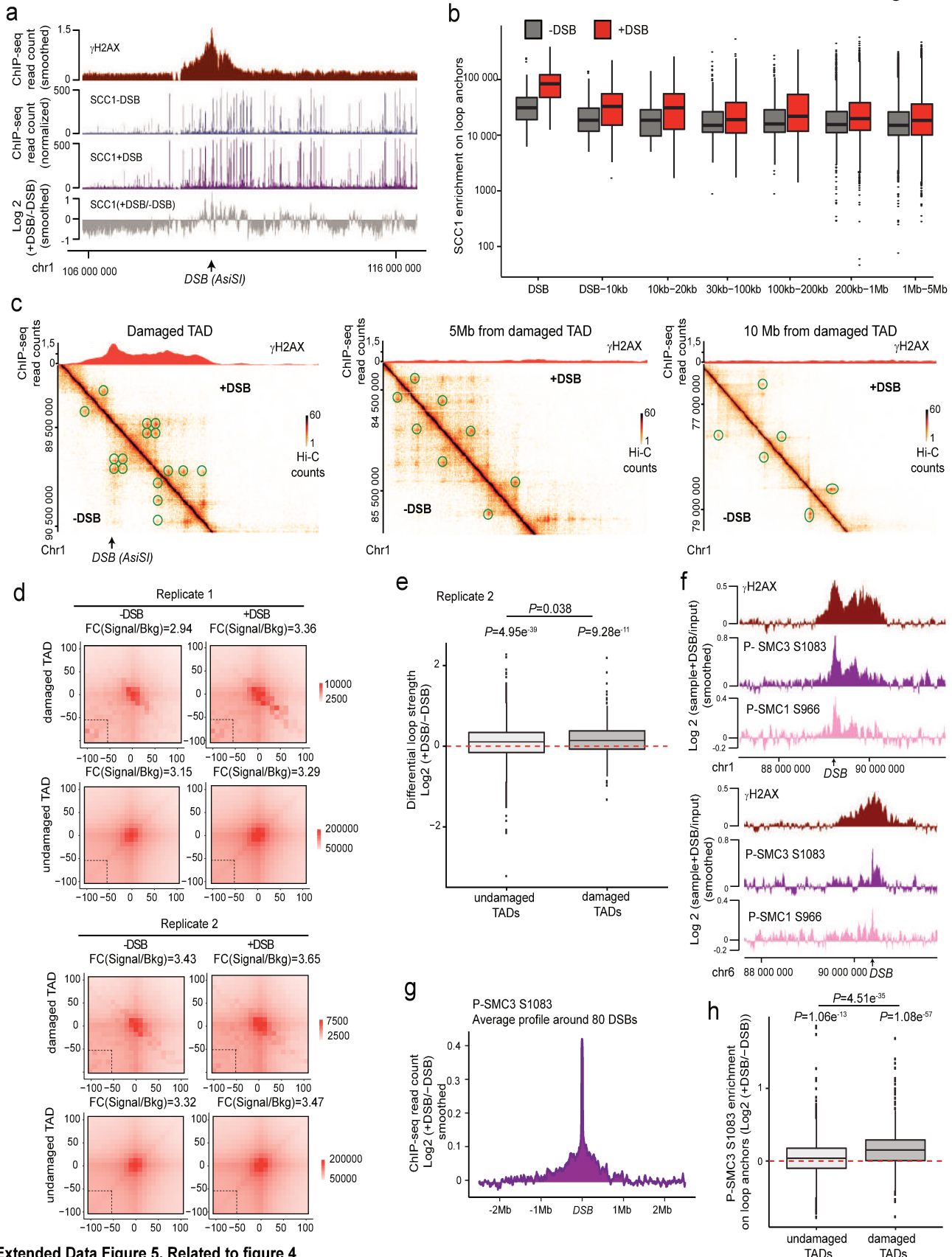


Figure 4. DSBs trigger modifications of cohesin biology at a genome-wide scale and accentuated in damaged TADs.

(a) Upper panel: Contact matrix (5kb resolution) showing the \log_2 (observed/expected) before or after DSB induction as indicated, on a region showing a loop on chromosome 20 and devoid of AsiSI site (no DSB). Loops anchors are circled and indicated by red and blue bars. Lower panel: Genome browser screenshot showing the SCC1 calibrated ChIP-seq on the same region before and after DSB induction as indicated. Cohesin enrichment at the loop anchors (blue and red bars) is increased after DSB (black arrows) compared to before DSB (grey arrows) in agreement with an increased loop strength (grey and black circles). (b) Violin plots showing the SCC1 enrichment at cohesin peaks before and after DSB induction as indicated. P values are indicated (paired one-sided Wilcoxon test). (c) Boxplot showing the quantification of SCC1 recruitment on loop anchors before (grey) and after (red) DSB induction, within damaged or undamaged TADs as indicated. P values between before and after DSB are indicated (two-sided Wilcoxon test). The increased SCC1 enrichment on loop anchors following DSB is significantly higher in damaged TADs as compared to undamaged TADs. Undamaged vs Damaged TADs, $P = 3.14e^{-47}$ (two-sided Wilcoxon test). (d) Boxplot showing the differential loops strength in undamaged or damaged TADs as indicated (see methods), computed from Hi-C data obtained before and after DSB. P values between before and after DSB are indicated (two-sided Wilcoxon test). The increased loop strength following DSB is significantly higher in damaged TADs as compared to undamaged TADs (two-sided Wilcoxon test). (e) Genome browser screenshot showing the γ H2AX ChIP-seq signal (smoothed on 50kb), SCC1 and phosphorylated SMC3 (p-SMC3 S1083) ChIP-seq signal expressed as the \log_2 ratio (+DSB/-DSB) (smoothed using a 20kb span). (f) Model: Cohesin-mediated loop extrusion ensures γ H2AX establishment on the entire damaged TAD. (i) Loop extrusion constantly occurs on the genome. (ii) The occurrence of a DSB creates a roadblock for cohesin-mediated loop extrusion leading to accumulation of cohesin at the site of damage. (iii) Cohesin anchored (or blocked) at DSB continues to mediate loop extrusion in a unidirectional manner (i.e. one-sided loop extrusion, arrows). ATM, which is recruited at the immediate vicinity of the break, phosphorylates H2AX-containing nucleosomes as they are extruded. Meanwhile, cohesin are also phosphorylated by ATM, which may modify loop extrusion properties (velocity, processivity etc...) and/or cohesin turnover (chromatin loading/unloading). (iv) The same process takes place on both sides of the DSB, leading to divergent one-sided loop extrusion at either side of the break ensuring a bidirectional spreading of γ H2AX. (v) Ongoing loop extrusion triggers enlargement of γ H2AX modified chromatin. Loop extrusion on both sides of the DSB halt at boundary elements such as CTCF-bound loci, that demarcate TAD borders. Given that the rate of loop extrusion measured in vitro is as high as 0.5 kb per second, this process ensures that the entire damaged TAD is phosphorylated in 10-30 minutes, giving rise to a DDR focus. Whether MDC1, 53BP1, ubiquitin and H1 depletion occurs as loop extrudes or once γ H2AX domain is fully established remains to be determined. NB: here the cohesin is shown as a ring encircling DNA for graphical reasons, but it is not known yet, whether and how cohesin ring entraps DNA during the loop extrusion process.


Extended Data Figure 5. Related to figure 4

(a) Genome browser screenshot representing the γ H2AX and the SCC1 ChIP-seq signal before (-DSB) and after (+DSB) induction. The ratio between before and after DSB induction is also shown (expressed as the log₂ +DSB/-DSB) and is smoothed on a 10kb span. **(b)** Boxplot showing the quantification of SCC1 recruitment on loop anchors, at different distances from DSB sites as indicated. **(c)** γ H2AX ChIP-seq signal and Hi-C signal at different distances from a damaged TAD of the chromosome 1 before (-DSB) and after DSB induction (+DSB). Green circles represent the chromatin loops. **(d)** Aggregate Peak Analysis (APA) plot on a 200 kb window (10 kb resolution) before (-DSB) and after DSB induction (+DSB) calculated for all loop anchors, in damaged and undamaged TAD as indicated. The fold change between the signal (central pixel) and the background (lower left corner 5x5 pixels) is indicated. **(e)** Boxplot showing the differential loops strength in undamaged or damaged TADs as indicated (see methods), computed from Hi-C data obtained before and after DSB. P values between before and after DSB are indicated (Wilcoxon test, $\mu=0$). The increased loop strength following DSB is significantly higher in damaged TADs as compared to undamaged TADs (Paired two-sided Wilcoxon test). **(f)** Genome browser screenshot showing γ H2AX, phosphorylated SMC3 (P-SMC3 S1083) and phosphorylated SMC1 (P-SMC1 S966) ChIP-chip signal expressed as the log₂ ratio sample/input after DSB induction and smoothed using a 500 probes span. Two damaged genomic locations are shown. **(g)** Average profile of P-SMC3 S1083 (expressed as the log₂ (+DSB/-DSB) ChIP-seq signal) around the eighty best-induced DSBs on a 4Mb window. **(h)** Boxplot showing the quantification of P-SMC3 S1083 signal on loop anchors, within damaged or undamaged TADs as indicated. P values between before and after DSB are indicated (paired two-sided Wilcoxon test). The increased P-SMC3 S1083 enrichment on loop anchors following DSB is significantly higher in damaged TADs as compared to undamaged TADs (two-sided Wilcoxon test).

218 reinforcement on the genome post irradiation³⁶. ChIP-chip analyses indicated that
219 phosphorylated SMC1 (pSMC1 S966) and SMC3 (pSMC3 S1083) accumulate on entire TADs
220 around DSBs (Extended Data Fig. 5f). ChIP-seq against pSMC3 S1083 further confirmed that
221 phosphorylated SMC3 increased at cohesin-bound sites and loop anchors within damaged
222 TADs (Fig. 4e, Extended Data Fig. 5g-h). These DSB-induced, ATM-mediated cohesin
223 modifications accumulating around DSBs, may regulate cohesin properties, such as loop
224 extrusion velocity or chromatin unloading, which could translate into increased cohesin
225 residence time at boundaries elements and further contribute to isolate DDR domains from
226 adjacent chromatin.

227

228 In summary, our work unambiguously shows that TADs are the template for the spreading of
229 many DSB repair signaling events such as the phosphorylation of H2AX, in agreement with a
230 recent report³⁹, the eviction of histone H1 and the accrual of 53BP1, MDC1 and ubiquitin,
231 allowing a DSB signaling at the megabase scale. Our data suggest a DSB-anchored cohesin-
232 mediated loop extrusion model that would mediate H2AX phosphorylation (Fig. 4f). In this
233 model, cohesin rapidly accumulates on both sides of a DSB in a manner that is fostered by
234 ATM, NIPBL and the MRN complex. Divergent one-sided loop extrusion hence takes place at
235 the DSB, which in turn allows the locally-recruited ATM to phosphorylate H2AX containing
236 nucleosomes as the chromatin fiber is pulled by the cohesin ring. Given that current estimates
237 of cohesin-mediated loop extrusion suggest a rate of 0.5-2 kb per second *in vitro*^{24,25}, such a
238 mechanism would allow DDR foci assembly in a very rapid manner, with the entire megabase-
239 sized chromatin domain being modified in about 10-30 min, which fits with the observed rate
240 of γ H2AX foci assembly⁹. This model would be in agreement with i) the finding that in yeast,
241 the ATM ortholog Tel1 mediates H2A phosphorylation in a manner that agrees with a 1D
242 sliding model rather than a 3D diffusion model⁴⁰ and ii) the recent observation, using light-

243 induced activation of Cas9, that γ H2AX is established at a speed of ~150kb per minute and can
244 in some instance reach up to 30Mb⁴¹. Moreover, our data also indicate that upon DSB induction,
245 the loop strength is reinforced, cohesin accumulates at loop anchors and the cohesin complex
246 itself is modified by ATM within damaged TADs. We propose that ATM-mediated
247 phosphorylation of the cohesin complex may alter the properties of cohesin such as loop
248 extrusion velocity or its capability to load onto/unload from chromatin. This may contribute to
249 further reinforce H2AX phosphorylation thanks to intra-TAD chromatin dynamics following
250 an initial loop-extrusion dependent γ H2AX establishment.

251 Recent work supports the key role of TADs borders and loop extrusion in the maintenance of
252 genome architecture and stability, including immunoglobulin loci rearrangements^{42,43} and in
253 DSB occurrence through topoisomerase reactions^{44,45}. Our study shows that genome
254 architecture is also instrumental for the correct establishment of γ H2AX and DDR foci
255 formation, expanding the function of genome organization within TADs to the response to DNA
256 damage. We propose that ongoing loop extrusion provides an efficient and rapid way to signal
257 a DSB and assemble a DDR focus, while boundary elements help constraining DDR signaling
258 to DSB-surrounding, self-interacting chromatin domains. This creates a specific repair prone
259 chromatin compartment, that displays modified dynamics properties, which may, for example
260 reduce search time for DNA end rejoining and homology search, and/or concentrate repair
261 factors.

262

263 **References**

- 264 1. Clouaire, T., Marnef, A. & Legube, G. Taming Tricky DSBs: ATM on duty. *DNA Repair*
265 (*Amst.*) **56**, 84–91 (2017).
- 266 2. McCord, R. P., Kaplan, N. & Giorgetti, L. Chromosome conformation capture and
267 beyond: toward an integrative view of chromosome structure and function. *Mol. Cell* **77**,
268 688–708 (2020).

- 269 3. Arnould, C. & Legube, G. The Secret Life of Chromosome Loops upon DNA Double-
270 Strand Break. *J. Mol. Biol.* **432**, 724–736 (2020).
- 271 4. Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W. M. Megabase chromatin domains
272 involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **146**, 905–916 (1999).
- 273 5. Clouaire, T. *et al.* Comprehensive Mapping of Histone Modifications at DNA Double-
274 Strand Breaks Deciphers Repair Pathway Chromatin Signatures. *Mol. Cell* **72**, 250–
275 262.e6 (2018).
- 276 6. Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M. R. & Elledge, S. J. MDC1 is a
277 mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* **421**, 961–966 (2003).
- 278 7. Caron, P. *et al.* Cohesin protects genes against γ H2AX Induced by DNA double-strand
279 breaks. *PLoS Genet.* **8**, e1002460 (2012).
- 280 8. Natale, F. *et al.* Identification of the elementary structural units of the DNA damage
281 response. *Nat. Commun.* **8**, 15760 (2017).
- 282 9. Ochs, F. *et al.* Stabilization of chromatin topology safeguards genome integrity. *Nature*
283 **574**, 571–574 (2019).
- 284 10. Iacovoni, J. S. *et al.* High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double
285 strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* **29**, 1446–1457 (2010).
- 286 11. Chang, L.-H., Ghosh, S. & Noordermeer, D. Tads and their borders: free movement or
287 building a wall? *J. Mol. Biol.* **432**, 643–652 (2020).
- 288 12. Caron, P. *et al.* Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA
289 Double-Strand Breaks. *Cell Rep.* **13**, 1598–1609 (2015).
- 290 13. Schwarzer, W. *et al.* Two independent modes of chromatin organization revealed by
291 cohesin removal. *Nature* **551**, 51–56 (2017).
- 292 14. Rao, S. S. P. *et al.* Cohesin loss eliminates all loop domains. *Cell* **171**, 305–320.e24
293 (2017).
- 294 15. Gelot, C. *et al.* The Cohesin Complex Prevents the End Joining of Distant DNA Double-
295 Strand Ends. *Mol. Cell* **61**, 15–26 (2016).
- 296 16. Meisenberg, C. *et al.* Repression of Transcription at DNA Breaks Requires Cohesin
297 throughout Interphase and Prevents Genome Instability. *Mol. Cell* **73**, 212–223.e7
298 (2019).
- 299 17. Potts, P. R., Porteus, M. H. & Yu, H. Human SMC5/6 complex promotes sister
300 chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to
301 double-strand breaks. *EMBO J.* **25**, 3377–3388 (2006).
- 302 18. Unal, E. *et al.* DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a
303 double-strand break-specific cohesin domain. *Mol. Cell* **16**, 991–1002 (2004).
- 304 19. Unal, E., Heidinger-Pauli, J. M. & Koshland, D. DNA double-strand breaks trigger
305 genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* **317**, 245–248
306 (2007).

- 307 20. Ström, L. *et al.* Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced
308 by a single DNA break. *Science* **317**, 242–245 (2007).
- 309 21. Ström, L., Lindroos, H. B., Shirahige, K. & Sjögren, C. Postreplicative recruitment of
310 cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Mol. Cell* **16**, 1003–1015
311 (2004).
- 312 22. Bauerschmidt, C. *et al.* Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA
313 double-strand breaks in replicated chromatin. *Nucleic Acids Res.* **38**, 477–487 (2010).
- 314 23. Covo, S., Westmoreland, J. W., Gordenin, D. A. & Resnick, M. A. Cohesin Is limiting
315 for the suppression of DNA damage-induced recombination between homologous
316 chromosomes. *PLoS Genet.* **6**, e1001006 (2010).
- 317 24. Davidson, I. F. *et al.* DNA loop extrusion by human cohesin. *Science* **366**, 1338–1345
318 (2019).
- 319 25. Kim, Y., Shi, Z., Zhang, H., Finkelstein, I. J. & Yu, H. Human cohesin compacts DNA
320 by loop extrusion. *Science* **366**, 1345–1349 (2019).
- 321 26. Ganji, M. *et al.* Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* **360**,
322 102–105 (2018).
- 323 27. Vian, L. *et al.* The energetics and physiological impact of cohesin extrusion. *Cell* **173**,
324 1165–1178.e20 (2018).
- 325 28. Fudenberg, G. *et al.* Formation of chromosomal domains by loop extrusion. *Cell Rep.* **15**,
326 2038–2049 (2016).
- 327 29. Schmitt, A. D. *et al.* A compendium of chromatin contact maps reveals spatially active
328 regions in the human genome. *Cell Rep.* **17**, 2042–2059 (2016).
- 329 30. Mirny, L. A., Imakaev, M. & Abdennur, N. Two major mechanisms of chromosome
330 organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **58**, 142–152 (2019).
- 331 31. Aymard, F. *et al.* Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination
332 at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 366–374 (2014).
- 333 32. Wutz, G. *et al.* Topologically associating domains and chromatin loops depend on
334 cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. *EMBO J.* **36**, 3573–
335 3599 (2017).
- 336 33. Haarhuis, J. H. I. *et al.* The cohesin release factor WAPL restricts chromatin loop
337 extension. *Cell* **169**, 693–707.e14 (2017).
- 338 34. Dauban, L. *et al.* Regulation of Cohesin-Mediated Chromosome Folding by Eco1 and
339 Other Partners. *Mol. Cell* **77**, 1279–1293.e4 (2020).
- 340 35. Lee, C.-S., Lee, K., Legube, G. & Haber, J. E. Dynamics of yeast histone H2A and H2B
341 phosphorylation in response to a double-strand break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 103–109
342 (2014).

- 343 36. Kim, B.-J. *et al.* Genome-wide reinforcement of cohesin binding at pre-existing cohesin
344 sites in response to ionizing radiation in human cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 22784–22792
345 (2010).
- 346 37. Sanders, J. T. *et al.* Radiation-Induced DNA Damage and Repair Effects on 3D Genome
347 Organization. *BioRxiv* (2019). doi:10.1101/740704
- 348 38. Kim, S.-T., Xu, B. & Kastan, M. B. Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-
349 dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev.* **16**, 560–570 (2002).
- 350 39. Collins, P. L. *et al.* DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in
351 a contact-dependent manner. *Nat. Commun.* **11**, 3158 (2020).
- 352 40. Li, K., Bronk, G., Kondev, J. & Haber, J. E. Yeast ATM and ATR kinases use different
353 mechanisms to spread histone H2A phosphorylation around a DNA double-strand break.
354 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2020). doi:10.1073/pnas.2002126117
- 355 41. Liu, Y. *et al.* Very fast CRISPR on demand. *Science* **368**, 1265–1269 (2020).
- 356 42. Zhang, Y. *et al.* The fundamental role of chromatin loop extrusion in physiological V(D)J
357 recombination. *Nature* **573**, 600–604 (2019).
- 358 43. Zhang, X. *et al.* Fundamental roles of chromatin loop extrusion in antibody class
359 switching. *Nature* **575**, 385–389 (2019).
- 360 44. Gothe, H. J. *et al.* Spatial chromosome folding and active transcription drive DNA
361 fragility and formation of oncogenic MLL translocations. *Mol. Cell* **75**, 267–283.e12
362 (2019).
- 363 45. Canela, A. *et al.* Topoisomerase II-Induced Chromosome Breakage and Translocation Is
364 Determined by Chromosome Architecture and Transcriptional Activity. *Mol. Cell* **75**,
365 252–266.e8 (2019).
- 366 46. Mangeot, P. E. *et al.* Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived
367 Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nat. Commun.* **10**, 45 (2019).
- 368 47. Marnef, A. *et al.* A cohesin/HUSH- and LINC-dependent pathway controls ribosomal
369 DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* **33**, 1175–1190 (2019).
- 370 48. Morawska, M. & Ulrich, H. D. An expanded tool kit for the auxin-inducible degron
371 system in budding yeast. *Yeast* **30**, 341–351 (2013).
- 372 49. Matelot, M. & Noordermeer, D. Determination of High-Resolution 3D Chromatin
373 Organization Using Circular Chromosome Conformation Capture (4C-seq). *Methods*
374 *Mol. Biol.* **1480**, 223–241 (2016).
- 375 50. Klein, F. A. *et al.* FourCSeq: analysis of 4C sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 3085–
376 3091 (2015).
- 377 51. David, F. P. A. *et al.* HTSstation: a web application and open-access libraries for high-
378 throughput sequencing data analysis. *PLoS One* **9**, e85879 (2014).
- 379 52. Kojic, A. *et al.* Distinct roles of cohesin-SA1 and cohesin-SA2 in 3D chromosome
380 organization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 496–504 (2018).

381

382

383 **Acknowledgments**

384

385 We thank the genomics core facility of EMBL for high throughput sequencing as well as the
386 facilities and expertise of the high throughput sequencing core facility of the I2BC (Centre de
387 Recherche de Gif), and F. Beckouet (CBI) for advice on the yeast work. Work in J.E.H.'s lab
388 was funded by grant R35 GM127029 from the U.S. National Institutes of Health. F.Z. was
389 supported by the National Institute of General Medical Sciences Training Grant
390 TM32GM007122. Funding in G.L.'s laboratory was provided by grants from the European
391 Research Council (ERC-2014-CoG 647344), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-
392 14-CE10-0002-01 and ANR-13-BSV8-0013), the Institut National Contre le Cancer (INCA),
393 the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC). C.A is a recipient of a FRM fellowship (FRM
394 FDT201904007941).

395

396

397 **Author contributions:** C.A., T.C., A-L.F., K.L., F.Z. and P.C. performed and analyzed
398 experiments. V.R. and R.M. performed bioinformatic analyses of 4C-seq, Hi-C and ChIP-seq
399 data sets. E.P.R. and P.E.M. provided nanoblades for CRISPR/cas9 experiments. D.N. helped
400 to realize and analyze 4C-seq experiments. G.L. conceived experiments and G.L. and T.C.
401 supervised experiments in human cells. J.E.H. conceived and supervised work in yeast. G.L.
402 wrote the manuscript. All authors commented and edited the manuscript.

403

404 **Competing interest statement**

405 The authors declare no competing interests.

406

407

408 **Methods**

409

410 **Cell culture and treatments**

411 DIvA (AsiSI-ER-U2OS) cells were grown in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM)
412 supplemented with 10% SVF (InVitrogen), antibiotics and 1 µg/mL puromycin (DIvA cells) at
413 37 °C under a humidified atmosphere with 5% CO₂. For DSB induction, cells were treated with
414 300nM 4OHT (Sigma, H7904) for 4 h. For ATM inhibition, cells were pretreated for 1 h with
415 20µM KU-55933 (Sigma, SML1109) and during subsequent 4OHT treatment. For ATR
416 inhibition, cells were pretreated for 1 h with 2µM ETP-46464 (Sigma, SML1321) and during
417 subsequent 4OHT or HU treatment (1h at 1mM (Sigma, H8627)). For kinetics experiment (Fig.
418 3a), cells were pretreated for 1h with 20µM KU-55933 (Sigma, SML1109) and during
419 subsequent 4OHT treatment before to be washed three times with PBS 1X and released during
420 0min, 5min, 15min or 1h. siRNA transfections were performed with a siRNA Ctrl:
421 CAUGUCAUGUGUCACAUCU and a siRNA targeting SCC1:
422 GGUGAAA AUGGCAUUACGG or WAPL: CGGACUACCCUUAGCACAA or NIPBL:
423 GCUCGGAACAAAGCAAUUA or MRE11: GCUAAUGACUCUGAUGAUA, using the 4D-
424 Nucleofector™ and the SE cell line 4D-Nucleofector™ X kit L (Lonza) according to the
425 manufacturer's instructions and subsequent treatment(s) were performed 48 h later. For
426 CRISPR/Cas9-mediated DSB induction, sgRNA (AsiSI site position:
427 "CGCCGCGATCGCGGAATGGA" or Position further within the TAD:
428 "GGGCCAGTCGCGGCACTCGC") were delivered in U2OS cells using the "nanoblades"
429 technology which relies on direct cell transduction with a viral-derived particle containing the
430 Cas9/sgRNA ribonucleoprotein^{46,47}. Cells were analyzed 24 h after transduction.

431 To make the *S. cerevisiae* strain yFZ014, a linearized *TIR1* gene was obtained through a
432 restriction enzyme digest of plasmid pJH2955 with PmeI1 and inserted into the *leu2* locus of
433 strain YSCL004³⁵. Insertion of *TIR1*⁴⁸ was verified by PCR with primers internal to *TIR1* and
434 *leu2*. yFZ016 was made by PCR amplification of plasmid pJH2898 to produce a 9myc-
435 AID::KAN PCR product with homologies at each end to the C-terminus of Pds5; this PCR
436 product was inserted using standard yeast transformation protocols to produce a Pds5::9myc-
437 AID fusion protein. A Western Blot was used to verify the degradation of Pds5::9myc-AID in
438 yFZ014 and yFZ016 after auxin addition.

439

440 **Immunofluorescence**

441 DIvA cells were plated on glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde during 15 min
442 at room temperature, permeabilized with 0,5% Triton X-100 in PBS for 10 min then blocked
443 with 3% BSA in PBS for 30min. Cells were then incubated with the primary antibody
444 (referenced in Table S2) diluted in PBS-BSA overnight at 4°C, washed with 1X PBS and
445 incubated with the appropriate anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (conjugated to
446 Alexa 594 or Alexa 488, Invitrogen), diluted 1:1000 in PBS-BSA, for 1h at room temperature,
447 followed by DAPI staining. Coverslips were mounted in Citifluor (Citifluor, AF-1). Image
448 acquisition was performed with MetaMorph on a wide-field microscope (Leica, DM6000)
449 equipped with a camera (DR-328G-C01-SIL-505, ANDOR Technology) using 40x or 100x
450 objectives. For the quantification, cells were acquired with a 40x objective and analyzed using
451 Columbus software (Perkin Elmer). γ H2AX foci were detected using the method D.

452 **Western Blot**

453 For SCC1, WAPL, NIPBL and MRE11 detection, cells were incubated in RIPA buffer (50 mM
454 Tris at pH 8, 150 mM NaCl, 0.5% deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS) for 20 min on ice and

455 centrifuged at 13,000 rpm for 10 min to remove insoluble material. SDS loading buffer and
456 reducing agent were then added to the supernatant. For Phospho-CHK1 detection, cells were
457 resuspended in 100 μ L of histone extraction buffer (1% SDS, 1% Triton, 10mM Tris pH7.5,
458 0.5M NaCl, phosphatase 0.01X (Sigma, P5726) and Complete protease inhibitors 1X (Sigma,
459 11873580001)) and sonicated 2 times 10sec with an amplitude of 30% before addition of SDS
460 loading buffer and reducing agent. All protein extracts were resolved on 3%–8% NuPAGE
461 Tris-acetate gels (Invitrogen) and transferred onto PVDF membranes (Invitrogen) according to
462 the manufacturer's instructions. Membranes were blocked in TBS containing 0.1% Tween 20
463 (Sigma, P1379) and 3% nonfat dry milk for 1h followed by an overnight incubation at 4°C with
464 primary antibodies (referenced in Table S2). The appropriate horseradish peroxidase-coupled
465 secondary antibodies were used to reveal the proteins (antimouse at 1:10,000 (Sigma, A2554)
466 and antirabbit at 1: 10,000 (Sigma, A0545)) using a luminol-based enhanced
467 chemiluminescence HRP substrate (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate,
468 Thermo Scientific). Pictures of the membranes were acquired with the ChemiDoc™ Touch
469 Imaging System.

470 **Hi-C**

471 Hi-C experiments were performed in DlvA cells using the Arima Hi-C kit (Arima Genomics)
472 according to the manufacturer's instructions. 1×10^6 cells were used by condition and
473 experiments were performed in duplicates. Briefly, cells were cross-linked with 2%
474 formaldehyde for 10 min at RT, lysed and chromatin was digested with two different restriction
475 enzymes included in the kit. Ends were filled-in in the presence of biotinylated nucleotides,
476 followed by subsequent ligation. Ligated DNA was sonicated using the Covaris S220 to an
477 average fragment size of 350 bp with the following parameters (Peak incident power: 140; Duty
478 factor: 10%; Cycles per burst: 200; Treatment time: 70s). DNA was then subjected to a double-
479 size selection to retain DNA fragments between 200 and 600 bp using Ampure XP beads

480 (Beckman Coulter). Biotin-ligated DNA was precipitated with streptavidin-coupled magnetic
481 beads (included in the kit). Hi-C library was prepared on beads using the NEBNext® Ultra™
482 II DNA Library Prep Kit for Illumina and NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina (New
483 England Biolabs) following instructions from the Arima Hi-C kit. The final libraries were
484 subjected to 75 bp paired-end sequencing on a Nextseq500 platform at the EMBL Genomics
485 core facility (Heidelberg, Germany). Hi-C reads were mapped to hg19 and processed with
486 Juicer using default settings (<https://github.com/aidenlab/juicer>). Matrix-balanced Hi-C count
487 matrices were generated at multiple resolutions: 100 kb, 50 kb, 25 kb, 10 kb and 5 kb and
488 visualized on Juicebox and on Hi-Glass.

489 **4C-seq**

490 The 4C-seq experiments were realized as in ⁴⁹ with minor modifications. Briefly, 15×10^6 D1vA
491 cells were cross-linked with 2% formaldehyde for 10 min at RT, lysed and digested with MboI
492 (New England Biolabs). Two or three rounds of 4 h of digestion with MboI were necessary.
493 Digested DNA was then ligated with a T4 DNA ligase (HC) (Promega), purified and digested
494 with NlaIII overnight (New England Biolabs). After a second ligation step, DNA was purified
495 before proceeding to the library preparation. For DNA purification steps, AMPure XP beads
496 (Beckman Coulter) were used diluted at 1:10 in 20% PEG solution (PEG 8000 (Sigma) 20%,
497 2.5M NaCl, Tween 20 20%, Tris pH8 10mM, EDTA 1mM). For 4C-seq library preparation,
498 800ng-900ng of 4C-seq template was amplified using 16 individual PCR reactions with inverse
499 primers (PAGE-purified) including the Illumina adapter sequences and a unique index for each
500 condition (primers in Table S1). Libraries were purified with the QIAquick PCR Purification
501 Kit (Qiagen), pooled and subjected to 75 bp single-end sequencing on a Nextseq500 platform
502 at the I2BC Next Generation Sequencing Core Facility (Gif-sur-Yvette, France). Each sample
503 was then demultiplexed using a specific python script from the FourCSeq R package⁵⁰ thus
504 assigning each read to a specific viewpoint based to its primer sequence into separate fastQ

505 files. bwa mem was then used for mapping and samtools for sorting and indexing. A custom R
506 script (<https://github.com/bbcf/bbcfutils/blob/master/R/smoothData.R>)⁵¹ was used to build the
507 coverage file in bedGraph format, to normalize using the average coverage and to exclude the
508 nearest region from each viewpoint (viewpoint-containing restriction fragment and the two
509 adjacent restriction fragments). Then the bedGraph file was converted in a BigWig file using
510 bedGraphToBigWig program from UCSC.

511 **ChIP-seq and ChIP-chip**

512 For Fig. 1a, Ubiquitin, H1, γ H2AX and 53BP1 ChIP-seq data were retrieved from ⁵. ChIP
513 experiments of P-ATM and MDC1 were performed in DivA cells as in ¹⁰ with 200 μ g of
514 chromatin per immunoprecipitation. Prior to library preparation, samples from multiple ChIP
515 experiments of P-ATM and MDC1 were pooled and sonicated for 15 cycles (30 sec ON, 30 sec
516 OFF, high setting) with a Bioruptor (Diagenode) then concentrated with a vacuum concentrator
517 (Eppendorf). CTCF, P-SMC3 (S1083), and γ H2AX (Fig.3, Extended Data Fig. 4 and Extended
518 Data Fig. 1j) ChIP experiments were realized as follow: Briefly, cross-linked cells were first
519 lysed 10min at 4°C in 500 μ L of the Lysis Buffer 1 (10mM Tris pH8, 10mM NaCl, 0.5% NP-
520 40, Complete protease inhibitor (Sigma, 11873580001)) then 10min at 4°C in the Lysis buffer
521 2 (50mM Tris pH8, 10mM EDTA, 0.5% NP-40, Complete protease inhibitor (Sigma)) and
522 subsequently sonicated in 15ml conical tubes with a Bioruptor Pico (Diagenode) in the presence
523 of 800 mg of sonication beads (20 cycles of 30 sec ON/30 sec OFF) to an average fragment
524 size of 250pb. 200 μ g of chromatin were then immunoprecipitated as in ¹⁰. The antibodies used
525 are detailed in Table S2. Sequencing libraries were prepared by using 10 ng of purified DNA
526 (averaged size 250-300 bp) with the NEBNext® Ultra™ II Library Prep Kit for Illumina (New
527 England Biolabs) using the application note for “Low input ChIP-seq.”, and subjected to 75 bp

528 single-end sequencing on a Nextseq500 platform at the EMBL Genomics core facility
529 (Heidelberg, Germany).

530 For the calibrated ChIP-seq of SCC1, we used a spike-in method ⁵². Briefly, cross-linked cells
531 from DIvA cells or from ES cells were lysed and fragmented as for CTCF, P-SMC3 (S1083)
532 and γ H2AX from Fig.3 and Extended Fig. 4. Prior to immunoprecipitation with SCC1 antibody,
533 20% of chromatin from mouse ES cells (40 μ g) was added to chromatin prepared from treated
534 or untreated human DIvA cells (200 μ g). Sequencing libraries were prepared from IP and input
535 samples using the NEBNext® Ultra™ II Library Prep Kit for Illumina and subjected to 75 bp
536 single-end sequencing on a Nextseq500 platform at the EMBL Genomics core facility
537 (Heidelberg, Germany). First, SCC1 was aligned on the mouse genome (mm10) with bwa in
538 order to only map the reads used as a reference for the normalization (spike-in). Remaining
539 unmapped reads were re-converted into a fastQ file using bam2fastq and mapped to the human
540 genome (hg19) using bwa. Samtools was used for sorting and indexing, and reads mapped to
541 the mouse genome were used as a normalization factor, as in ⁵² and using the following formula.

542
$$\frac{(Input_{ctrl} \times reads_{exp})}{(Input_{exp} \times reads_{ctrl})}$$

543 where $Input_{ctrl}$ is the total number of reads mapped in ES Input (Mouse) and $Input_{exp}$ the
544 total number of reads in DIvA Input. $reads_{ctrl}$ and $reads_{exp}$ were respectively the number of
545 reads from immunoprecipitated samples mapped on the mm10 genome and hg19 genome.

546 For the calibrated SCC1 ChIP-qPCR, the immunoprecipitated samples from DIvA cells were
547 normalized by the signal of the immunoprecipitated sample from ES cells on a mouse cohesin
548 positive site (using primers in Table S1).

549 For the ChIP-chip experiments, the immunoprecipitated samples of γ H2AX, P-SMC1 S966, P-
550 SMC3 S1083 and input samples were amplified as in Ref. ¹⁰, labeled, and hybridized on
551 Affymetrix tiling arrays covering human chromosomes 1 and 6 (at the Genotoul GeT-biopuces

552 facility (Toulouse, France). Scanned array data were normalized using Tiling Affymetrix
553 Software (TAS) (quantile normalization, scale set to 500) and analyzed as described in 10,12
554 and converted to .wig files using R/Bioconductor software, when necessary, for visualization
555 using the Integrated Genome Browser (bioviz.org).

556 For the ChIP experiment in yeast, individual colonies of yFZ014 and yFZ016 were grown in
557 YEP + 3% lactic acid (YEP-Lac) until log phase growth with a final cell concentration between
558 5×10^6 cells/ml and 8×10^6 cells/ml. Degradation of Pds5::9myc-AID in yFZ016 was induced
559 by addition of auxin (indole-3-acetic acid (IAA) Sigma Aldrich # I3750) at a final concentration
560 of 1 mM and confirmed by Western blotting. For chromatin immunoprecipitation, 45 ml of
561 culture was fixed and cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min, after which 2.5 ml of 2.5
562 M glycine was added for 5 min to quench the reaction. Cells were pelleted and washed 3 times
563 with 4°C TBS. Yeast cell walls were disrupted by beating the cells with 425-600 μ m glass beads
564 for 1 h in lysis buffer at 4°C. The lysate was sonicated for 2 min to obtain chromatin fragments
565 of ~500 bp in length. Debris was then pelleted and discarded, and equal volume of lysate was
566 immunoprecipitated using γ -H2A antibody for 1 h at 4°C, followed by addition of Protein-A
567 agarose beads (Sigma-Aldrich #1719408001) for 1 h at 4°C. The immunoprecipitate was then
568 washed twice in 140 mM NaCl lysis buffer, once with 0.5 M NaCl lysis buffer, once with 0.25
569 M LiCl wash buffer and once with TE. Crosslinking was reversed at 65°C overnight followed
570 by proteinase K and glycogen addition for 2 h. Protein and nucleic acids were separated by
571 phenol extraction. LiCl was added to a final concentration of 400 mM LiCl. DNA was
572 precipitated using 99.5% EtOH. A second precipitation step was carried out using 75% EtOH
573 and the DNA resuspended in TE. Sequencing libraries were prepared and sequenced as for
574 ChIP-seq in human cells.

575

576 **Hi-C, 4C-seq and ChIP-seq analyses**

577 *Hi-C heatmaps.* Hi-C heatmaps screenshots were generated using Juicebox stand-alone
578 program (<https://github.com/aidenlab/Juicebox/wiki/Download>). To build the average
579 heatmaps, sub-matrix for *cis* interactions around DSBs were extracted using Juicer, both for
580 observed matrix and observed over expected matrix. Log₂(ratio) after vs before DSB were
581 computed, using both Hi-C replicates, and averaged for each bin of the final matrix.

582 *Insulation score and TAD calling.* Insulation score was computed using Hi-C matrices at 50 kb
583 resolution with `matrix2insulation.pl` (<https://github.com/dekkerlab/crane-nature-2015>). As
584 parameters, we used `is=800000` and `ids=100000`. TADs were called using Hi-C matrices at 50
585 kb resolution with TopDom R package and window size parameter of 10
586 (<https://github.com/HenrikBengtsson/TopDom>). In order to filter out very weak TAD borders
587 (corresponding to sub-TAD borders), we filtered TAD borders with an insulation score below a
588 threshold of -0.05. For Extended Data Fig. 2d, 80 TADs were also randomly selected from
589 TopDom output, which didn't contain any of the best 80 cleaved DSBs, to be used as controls.

590 *Loops anchors and APA.* Loops were called using Juicer Tools HiCCUPS program at 10 kb and
591 25 kb resolutions (<https://github.com/aidenlab/juicer/wiki/HiCCUPS>). Aggregate Peak
592 Analysis (APA) was done using Juicer Tools APA program at 10 kb resolution
593 (<https://github.com/aidenlab/juicer/wiki/APA>). 525 loops were retrieved between the 174 best
594 cleaved DSBs and nearby loop anchors (<1Mb) for replicate 1 (Fig. 2c), and 552 for replicate
595 2 (Extended Data Fig. 2f). Fold change between Signal (central pixel) and background (upper
596 left corner 5×5 pixels) was computed. For Extended Data Fig. 5d, APA were generated for loops
597 filtered on their size (<200kb) and around the best 80 cleaved DSBs. 597 and 17206 loops in
598 damaged (80 damaged TADs) and undamaged TADs were retrieved respectively in Replicate
599 1, while 645 and 19150 were retrieved for Replicate 2. Fold change between Signal (central
600 pixel) and background (lower left corner 5×5 pixels) was computed. APA heatmaps were

601 reprocessed using ggplot2 in order to display counts at the same color scale between -DSB and
602 +DSB conditions. For Fig. 4d and Extended Data Fig. 5e, loop strength was extracted from APA
603 files enhancement.txt corresponding to enrichment fold-change (Peak to Mean, P2M).
604 Differential loop strength was the log-ratio of two condition loop strengths (+DSB/-DSB).

605 *ChIP-seq analyses.* ChIP-seq data were processed using same procedure as in ref⁵, except for
606 yeast ChIP-seq, which was aligned on *Saccharomyces cerevisiae* R64-1-1 assembly, and
607 without PCR duplicate removal. SCC1 and CTCF Peaks were identified using MACS2 program
608 with callpeak algorithm, with default setting, using Input as control and the SCC1 ChIP-seq
609 data before break induction as sample. For SCC1, before breaks, 46184 peaks were identified,
610 with a median and a mean size of 628 and 742 respectively. For CTCF before breaks, 96801
611 peaks were identified, with a median and a mean size of 339 and 500 respectively. Overlap
612 between CTCF peaks and CTCF motifs was then performed, in order to associate a peak with
613 the orientation of its motif.

614 *4C-seq.* For differential analyses of the 4C-seq data, the log₂ ratio between two bam files was
615 computed using bamCompare from deeptools, with the parameters --binSize=50 and --
616 operation=log2. Each boxplot represents the mean of the 4C-seq ratio on 1 MB around each
617 viewpoint.

618 **Data Availability:** High throughput sequencing data have been deposited to Array Express
619 under accession number E-MTAB-8851. ChIP-chip data have been deposited to Array Express
620 under accession number E-MTAB-8793. Other data and source codes are available upon
621 request.

622
623

Supplementary Table 1: Primer sequences

Application	Name	Forward primer	Reverse primer
4C-seq	Viewpoint DSB1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNN
		CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAA CCTGGCAACTTATGAATCAGGA	NGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTATGTCAAAGCCAAGGGGACA
4C-seq	Viewpoint DSB2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNN
		CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTC CTTACGATTATTTGTAATTTG	NGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTAAGCTAATTCTGAGTTACATACATT
4C-seq	Viewpoint DSB3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNN
		CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGA TTACGTAGAAGGGTGCC	NGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTAAGGCAAATGATAACCCCTGT
4C-seq	Viewpoint ctrl region	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNN
		CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTC CTCAGGTTATCATCCAA	NGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTCACCTTCGCTGTACCTTTG
4C-seq	Viewpoint CRISPR site	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNN
		CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTA AGCACCTCCTCCTAG	NGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTACCTTTACACCTCAAACCT
4C-seq	Viewpoint 470 kb upstream (Fig. 1c)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNN
		CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAC AAGGAAGAAGCAGGCATTCA	NGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTTTGAAATGAGTACTCTGCCATCCA
ChIP-qPCR	Ctrl region	AGCACATGGGATTTTGCAAGG	TTCCCTCCTTTGTGTACCA
ChIP-qPCR	DSB site 1	TCCCCTGTTTCTCAGCACTT	CTTCTGCTGTTCTGCGTCT
ChIP-qPCR	DSB site 2	CCGCCAGAAAGTTTCCTAGA	CTCACCTTGCAGCACTTG
ChIP-qPCR	DSB site 3	CCTAGCTGAGGTGCGGTGCTA	GAAGAGTGAGGAGGGGGAGT
ChIP-qPCR	Cohesin positive site (mouse)	CAGAGATTTGCGGTGTTCCG	TTCACACCTAGAGGAGGGGT

NNN is the position of the optional index

Supplementary Table 2: Antibodies

Target	Application	Reference	Quantity
γH2AX (S139)	ChIP	Merck Millipore 07-164	2 μg
γH2AX (S139)	IF	Merck Millipore 05-636 (clone JBW301)	1:1000
P-ATM (S1981)	ChIP	Abcam ab81292	2 μg
MDC1	ChIP	Abcam ab11171	3 μg
SCC1	ChIP	Abcam ab992	4 μg
SCC1	Western Blot	Abcam ab992	1:500
WAPL	Western Blot	Santa Cruz sc-365189	1:500
NIPBL	Western Blot	Bethyl Laboratories A301-779A	1:1000
MRE11	Western Blot	GeneTex GTX70212 (clone 12D7)	1:4000
Phospho-CHK1 (ser345)	Western Blot	Cell Signaling 2348S	1:1000
P-SMC1 (S966)	ChIP	Epitomics EP2858Y	2 μL
P-SMC3 (S1083)	ChIP	Bethyl Laboratories A300-480A	2 μg
CTCF	ChIP	Millipore 07-729	4 μL
γH2A (yeast)	ChIP	Abcam ab15083	2μg

II. Réorganisation de la chromatine en 3D à différentes échelles en réponse aux cassures double-brin de l'ADN

1. Introduction

Depuis quelques années, de plus en plus d'observations ont montré le rôle majeur de la composition de la chromatine dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN (DSB). Ces modifications de la chromatine ont lieu à différentes échelles et sont également accompagnées de modifications des propriétés de la chromatine en réponse aux DSB (par exemple sa dynamique ou sa compaction). Cependant, la façon dont l'organisation de la chromatine dans le noyau est impliquée dans la réparation, et l'impact de l'apparition de DSB sur la conformation de la chromatine ne sont pas encore bien établis. Des études préalables ont montré que les DSB sont capables de se regrouper dans le noyau (Aten, 2004; Aymard et al., 2017; Caron et al., 2015; Schrank et al., 2018). De façon importante, cette juxtaposition de plusieurs DSB peut conduire à l'apparition de translocations (Roukos et al., 2013). Cependant la fonction et les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ce processus de « clustering » restent en grande part inconnus. Outre ce processus de regroupement des DSB dans le noyau, des changements de conformation et de la dynamique des chromosomes s'opèrent suite à l'induction de DSB sur le génome. Par exemple chez *S.Cerevisiae*, la dynamique de l'ensemble du génome est modifiée suite à l'induction d'une DSB (Hauer et al., 2017).

Au cours de l'étude précédente, nous avons montré que les processus impliqués dans la formation des TAD par loop extrusion sont impliqués dans l'établissement des foyers de réparation. Cependant l'impact des DSB sur la conformation des chromosomes et leur organisation dans le noyau reste peu caractérisé.

Afin de répondre à ces questions, nous avons analysé à haute-résolution et sur le génome entier l'impact de l'induction de DSB sur la conformation de la chromatine, à l'aide du système DlvA et de technologies telles que le Hi-C et le 4C-seq. Nous nous sommes intéressés aux changements de la conformation des chromosomes induits par les DSB localement, en *cis* des DSB, ainsi que sur le reste du génome. Nous avons également étudié les modifications des interactions de la chromatine en *trans* afin de caractériser plus finement les événements de regroupement des DSB et leurs potentielles conséquences physiologiques. Enfin nous avons étudié l'impact de la conformation de la chromatine sur des événements liés au processus de réparation tels que la répression des gènes, événement nécessaire à la

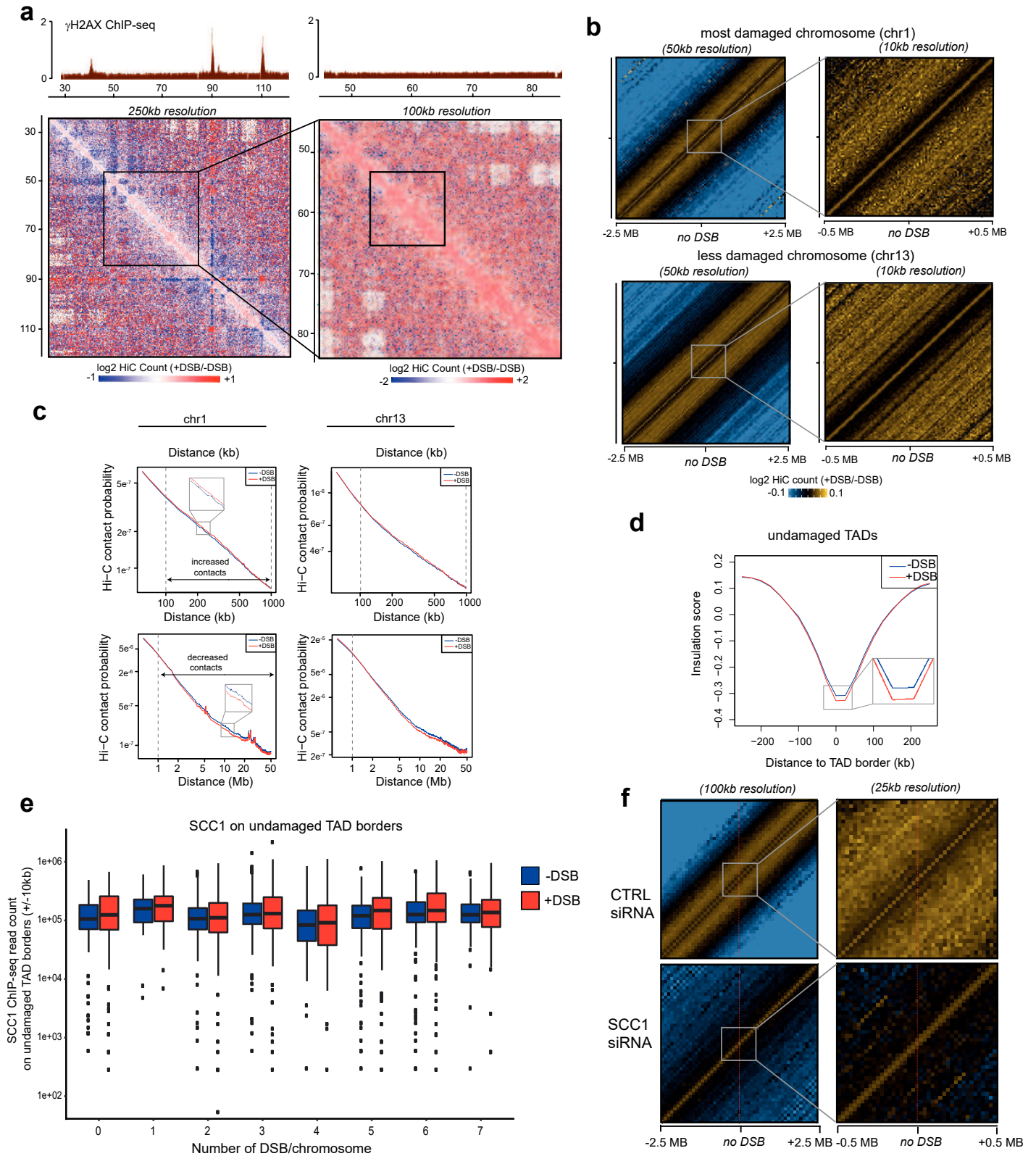


Figure 30: Renforcement des TAD du génome entier en réponse aux DSB dépendant des cohésines.

(a) Signal de ChIP-seq de γ H2AX indiquant la position des DSB et donc des TAD endommagés. Carte de contact de Hi-C exprimée en log₂ ratio +DSB/-DSB à des résolutions de 250 kb et de 100kb. (b) Cartes de contact de Hi-C générée sur la moyenne de régions aléatoires non endommagées, sur des fenêtres de 5 Mb et de 1Mb et à des résolutions respectives de 50kb et de 10kb. Le log₂ ratio +DSB/-DSB est représenté. (c) Quantification des probabilités de contact issues des données de Hi-C avant (-DSB) et après induction de DSB (+DSB) de régions non endommagées du chromosome 1 ou du chromosome 13 avec des régions en cis à des distances croissantes. (d) Quantification du score d'insulation autour des frontières de TAD non endommagés (déterminées à partir des données de Hi-C) avant (-DSB) et après induction de DSB (+DSB). (e) Quantification du signal de ChIP-seq de SCC1 autour des frontières de TAD non endommagés sur des chromosomes différents classés en fonction du nombre de DSB que possède les chromosomes. (f) Comme en (b) mais sur le génome entier non endommagé et avant ou après déplétion de SCC1 par siARN.

réparation des DSB. Les cohésines ayant été impliquées dans de multiples aspects de la réparation, nous avons étudié le rôle des cohésines à chacune de ces échelles de la réorganisation de la conformation de la chromatine post-DSB.

2. Résultats

A. Renforcement cohésine-dépendant des TAD à l'échelle du génome entier

Dans le but d'étudier les conséquences éventuelles de l'apparition de DSB sur l'organisation tridimensionnelle du génome à haute-résolution, nous avons réalisé des expériences de Hi-C dans le système DIvA précédemment décrit. Nous avons ainsi pu constater que l'organisation de la chromatine ne semble pas être altérée drastiquement par l'apparition de DSB dans le génome, en accord avec une étude récente (Sanders et al., 2019 BioRxiv). Néanmoins, après l'induction de DSB dans le génome, l'observation de la matrice de Hi-C révèle une augmentation générale sur les chromosomes des interactions moyennes distances (<1Mb, diagonale rouge) et une diminution des interactions longues distances, et ce même en dehors des TAD endommagés (c'est à dire au sein desquels une DSB a été induite) (>1Mb, zones bleues de part et d'autre de la diagonale rouge) (Figure 30a). De façon intéressante, ce renforcement des interactions moyennes distances observé, ainsi que la diminution des interactions plus longues distances, sont observés de façon équivalente sur un chromosome comportant beaucoup de DSB (dix) ou sur un chromosome ne comportant qu'une DSB (Figure 30b et Figure 30c pour la quantification des contacts en fonction de la distance).

Ces changements provoqués par l'apparition de DSB dans le génome semblent se produire à une échelle similaire à la taille des TAD (<1Mb). Ces observations pourraient ainsi être le résultat d'un renforcement des TAD, c'est-à-dire à une augmentation des interactions intra-TAD et une plus forte insulation entre les TAD adjacents. En accord avec cette hypothèse, le score d'insulation des frontières de TAD est sensiblement plus fort dans les cellules endommagées que dans les cellules non endommagées (Figure 30d).

Dans notre article précédent, nous avons montré que les cohésines étaient davantage recrutées sur les ancres de boucles des TAD endommagés après l'induction de DSB (partie I). De façon intéressante, nos données de ChIP-seq contre SCC1 indiquent un niveau accru de cohésines sur leur site de fixation également dans les TAD non endommagés après

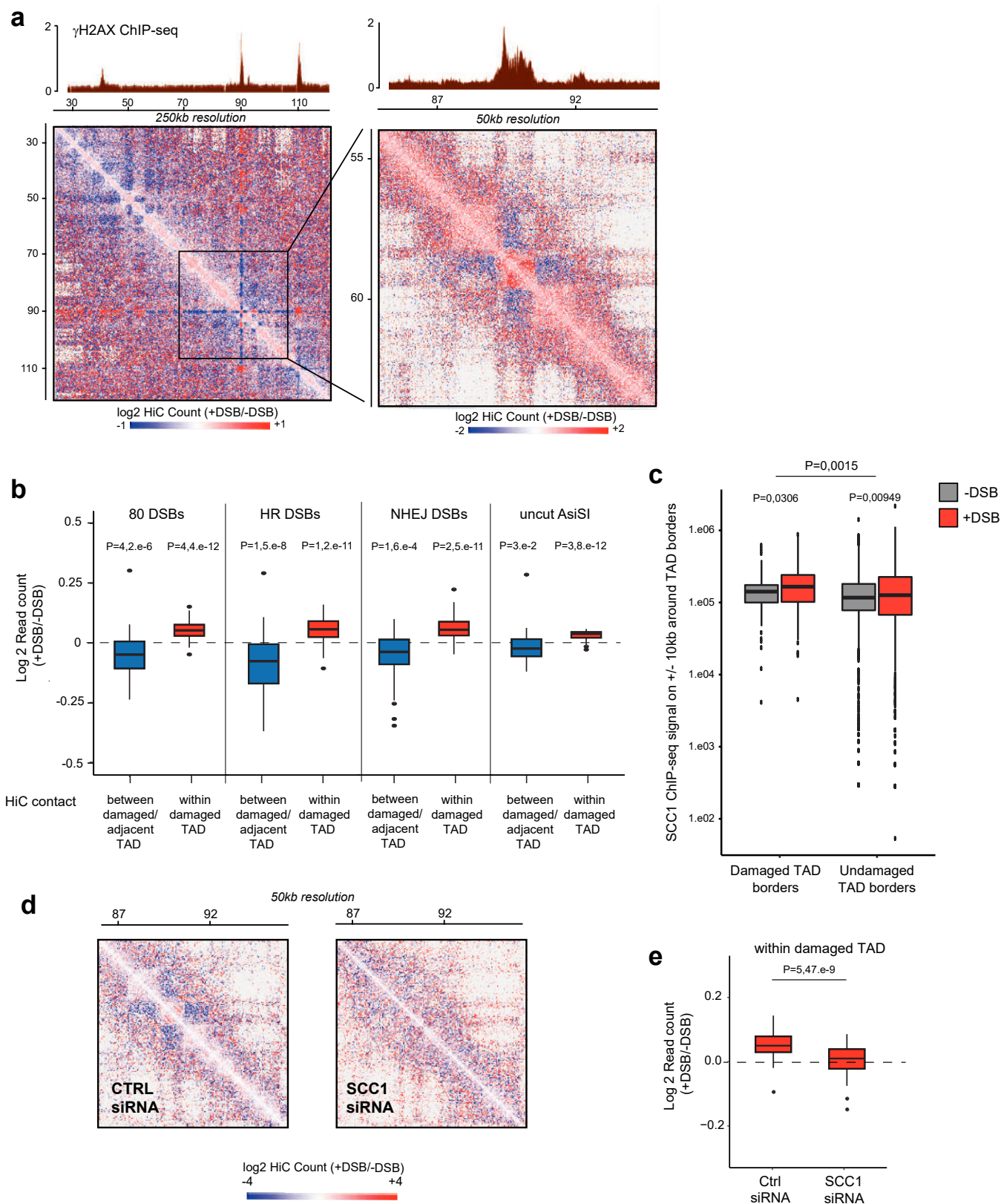


Figure 31: Le renforcement des TAD SCC1-dépendant est plus prononcé dans les TAD endommagés.

(a) Signal de ChIP-seq de γ H2AX indiquant la position des DSB et donc des TAD endommagés. Carte de contact de Hi-C d'un fragment du chromosome 1, exprimée en log2 ratio +DSB/-DSB à des résolutions de 250 kb et de 50kb. (b) Quantification des interactions à l'intérieur des TAD endommagés ou non endommagés (en rouge) et des interactions entre des TAD endommagés ou non et leur TAD adjacent (en bleu). Les résultats sont présentés en log2 ratio +DSB/-DSB. (c) Quantification du signal de ChIP-seq de SCC1 avant (-DSB) et après induction de DSB (+DSB) sur des frontières de TAD endommagés ou non endommagés. (d) Carte de contact de Hi-C à une résolution de 50kb et centrée sur le TAD endommagé de (a) avant ou après déplétion de SCC1. Les données sont représentées en log2 ratio +DSB/-DSB. (e) Quantification des interactions à l'intérieur des TAD endommagés avant ou après déplétion de SCC1. Les données sont représentées en log2 ratio +DSB/-DSB.

RÉSULTATS

induction de DSB sur le génome et ce, de façon indépendante du nombre de DSB par chromosome (Figure 30e). Ces résultats (augmentation des cohésines, augmentation des interactions <1Mb, et augmentation de la force d'insulation aux frontières de TAD) suggèrent que suite à l'induction de DSB, tous les TAD d'un chromosome sont renforcés d'une façon qui ne dépend pas du nombre de DSB induites par chromosome.

Afin d'étudier la fonction des cohésines dans ce phénomène de renforcement des TAD, nous avons réalisé des expériences de Hi-C dans des cellules déplétées pour la protéine SCC1. De façon intéressante, la déplétion de SCC1 conduit à une perte du renforcement des TAD post-DSB (Figure 30f).

L'ensemble de ces résultats indique que l'apparition de DSB dans le génome provoque une réponse générale à l'échelle du noyau conduisant à un renforcement de l'ensemble des TAD, d'une façon qui dépend des cohésines.

B. Le renforcement des TAD après dommage est plus prononcé dans les TAD endommagés

Afin d'étudier si l'apparition de DSB pourrait avoir un impact particulier sur la conformation de la chromatine en *cis* des DSB, nous avons ensuite examiné la conformation des TAD directement endommagés. De façon intéressante, les TAD endommagés montrent 1) un renforcement suite aux DSB plus marqué que dans les autres TAD du génome et 2) un isolement très prononcé du reste du génome (Figure 31a, voir les « croix bleues »).

Dans une étude précédente, nous avons déterminé les 80 DSB les plus induites de notre système DivA, les 30 DSB réparées préférentiellement par HR ou celles réparées préférentiellement par NHEJ (Clouaire et al., 2018). La quantification des interactions au sein des 80 TAD les plus endommagés, montre bien une augmentation de ces contacts intra-TAD post induction de DSB, par comparaison avec des TAD non endommagés. De plus les TAD endommagés engagent moins d'interactions avec leurs TAD adjacents suite à l'induction des DSB (Figure 31b). De façon intéressante, le renforcement des TAD endommagés n'est pas dépendant du mécanisme de réparation utilisé préférentiellement par les DSB (Figure 31b). En accord avec ces résultats, SCC1 est davantage recruté post-DSB sur les frontières des 80 TAD endommagés par comparaison avec les frontières de TAD non endommagés (Figure 31c). Enfin, la déplétion de SCC1 montre que ce renforcement très marqué des TAD

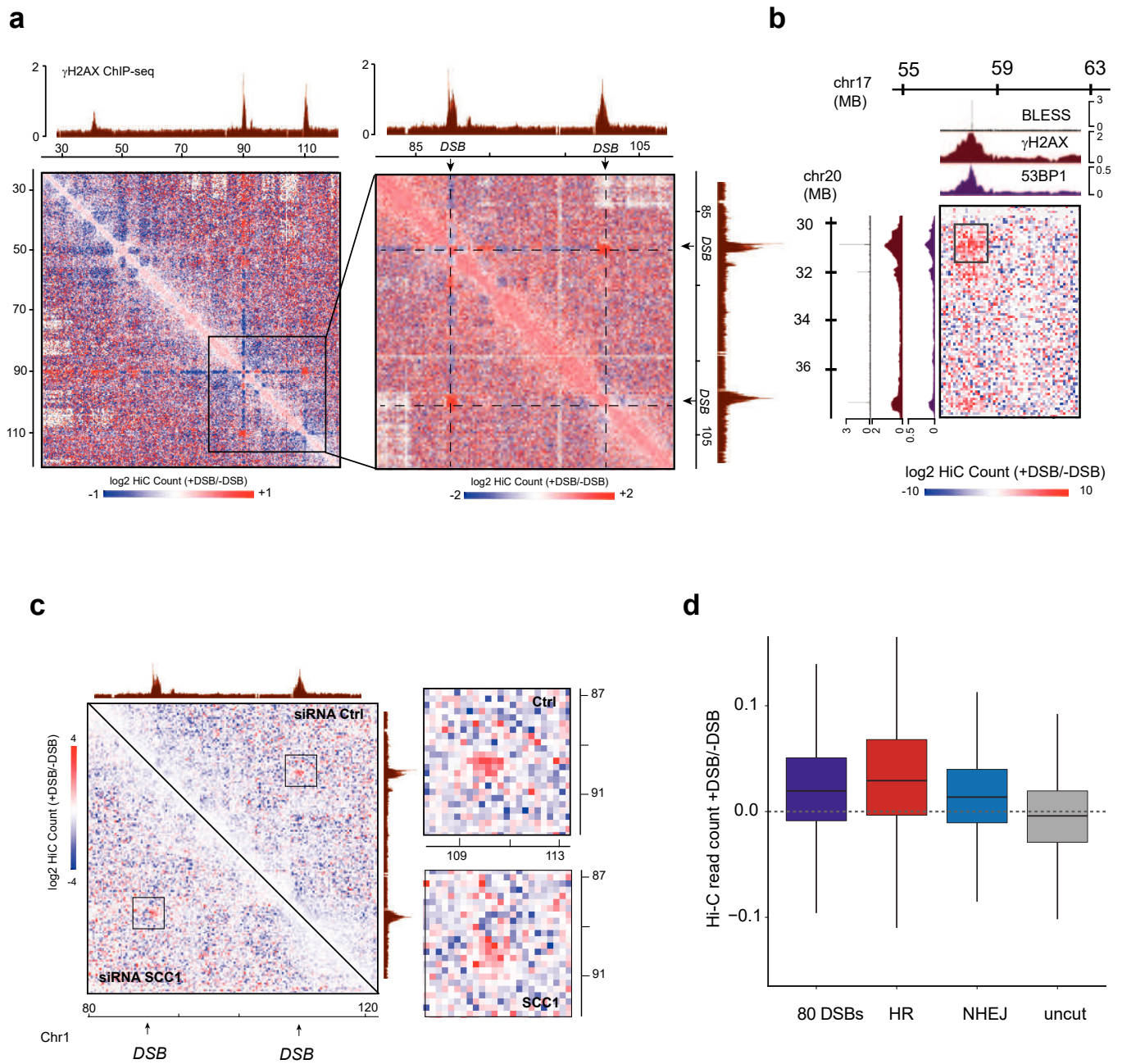


Figure 32: Les DSB se regroupent entre elles à l'échelle du TAD entier.

(a) Signal de ChIP-seq de γ H2AX indiquant la position des DSB et donc des TAD endommagés. Carte de contact de Hi-C d'un fragment du chromosome 1, exprimée en log₂ ratio +DSB/-DSB à des résolutions de 250 kb et de 100kb. (b) Carte de contact de Hi-C montrant les interactions entre les chromosomes 20 et 17, exprimée en log₂ ratio +DSB/-DSB. (c) Carte de contact de Hi-C d'un fragment du chromosome 1 avant ou après déplétion de SCC1, exprimée en log₂ ratio +DSB/-DSB et à une résolution de 250kb. (d) Quantification des interactions des TAD endommagés avec les autres TAD endommagés (des 80 DSB les mieux induites, des 30 DSB réparées préférentiellement par HR ou par NHEJ) ou des TAD non endommagés entre eux (uncut).

RÉSULTATS

endommagés dépend également des cohésines (Figure 31d et 31e pour la quantification des interactions intra-TAD).

L'ensemble de ces résultats suggère que le renforcement des TAD après induction de DSB observable sur le génome entier est accru dans les TAD endommagés, et ce de façon indépendante du mécanisme de réparation préférentiellement recruté aux DSB. De plus, ces deux phénomènes semblent dépendre du recrutement plus important des cohésines aux frontières de TAD, lui-même également plus marqué dans les TAD endommagés.

C. Le regroupement des DSB est réalisé à l'échelle du TAD, permettant la formation de « TAD cliques »

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de l'induction de DSB sur les changements de conformation de la chromatine à plus grande échelle. Dans une étude précédente nous avons démontré par Capture Hi-C que les DSB étaient capables de se regrouper entre elles, notamment les DSB sujettes à la réparation par recombinaison homologe et induites dans les gènes actifs (Aymard et al., 2017). Cependant, la résolution de cette technique ne permettait pas de déterminer l'étendue de ces interactions entre DSB. Désormais, nos données de Hi-C ont permis de montrer que les interactions entre DSB sont réalisées à l'échelle des TAD endommagés entiers (Figure 32a). Ces contacts TAD-TAD endommagés sont visibles au sein d'un même chromosome mais également entre des chromosomes différents (Figure 32a-b). De façon importante, ce phénomène ne semble pas dépendre de SCC1 (Figure 32c). L'analyse de nos données de Hi-C confirme également que les DSB les plus sujettes à un regroupement sont les DSB réparées principalement par HR (Figure 32d).

Il a été rapporté récemment que les interactions TAD-TAD peuvent également conduire à des « TAD cliques » où plusieurs TAD (>2) peuvent interagir ensemble (Paulsen et al., 2019). Grâce à nos données de Hi-C, nous avons pu observer un comportement similaire des TAD endommagés puisque nous pouvons voir que ces derniers peuvent engager des contacts avec plusieurs autres TAD endommagés (Figure 33a). En effet, la quantification des TAD cliques a permis de mettre en évidence la formation d'un regroupement de jusqu'à six TAD endommagés (Figure 33b). Suite à l'induction de DSB, les TAD sont couverts par γ H2AX, 53BP1, par l'ubiquitinylation de la chromatine et déplétés en histone H1 après induction de DSB (partie I). De façon intéressante, nous pouvons observer ici que la quantité de TAD endommagés au sein d'un clique est proportionnelle à la quantité de γ H2AX, de 53BP1 et de

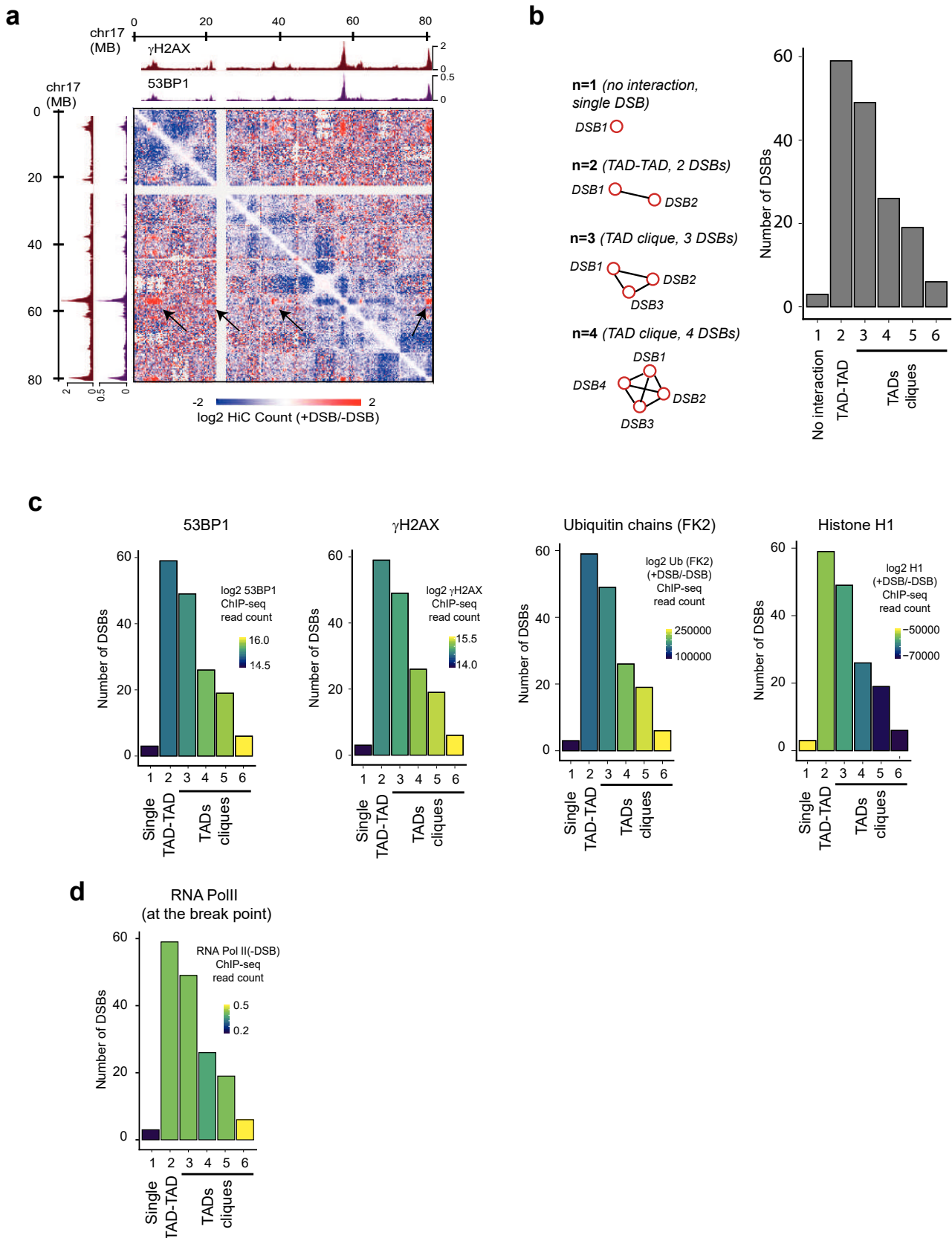


Figure 33: Les TAD endommagés forment des «TAD cliques».

(a) Signal de ChIP-seq de γ H2AX indiquant la position des DSB et donc des TAD endommagés. Carte de contact de Hi-C d'un fragment du chromosome 17, exprimée en \log_2 ratio +DSB/-DSB. **(b)** Quantification du nombre de DSB engagées dans un regroupement de DSB de deux ou plus de DSB ou non (no interaction). Les TAD cliques correspondent à un regroupement de plus de 2 TAD endommagés. **(c)** Comme en (b) mais coloré en fonction du signal de ChIP seq de γ H2AX ou 53BP1 ou de FK2 (ubiquitinylation) après induction de DSB. **(d)** Comme en (b) mais coloré en fonction du signal de ChIP seq de RNA PolII au site de dommage avant induction de DSB.

RÉSULTATS

chromatine ubiquitinylée et inversement proportionnelle à la quantité de H1 (Figure 33c). De plus, la quantité de TAD au sein des cliques est également proportionnelle à la quantité d'ARN PolII présente initialement au site de dommage (Figure 33d).

L'ensemble de ces résultats suggère que le clustering des DSB préalablement observé, consiste en réalité en l'interaction de deux ou plusieurs TAD endommagés ensemble, conduisant à la formation de TAD cliques. Ces TAD cliques surviennent essentiellement entre les TAD dont la DSB est induite au sein d'un locus transcrit. Ces interactions se font indépendamment de SCC1, mais coïncident avec des niveaux élevés de γ H2AX, d'ubiquitine, de 53BP1 et une déplétion accrue de H1.

D. Le regroupement des DSB à lieu en G1 et peut conduire à la formation de translocations

Des études contradictoires sont parues précédemment concernant la phase du cycle cellulaire dans laquelle se produisait ce regroupement des DSB (Aten, 2004; Aymard et al., 2017; Schrank et al., 2018). Afin de mieux comprendre la cause et la fonction biologique de ce phénomène, nous avons adressé à nouveau cette question avec des technologies spécifiquement adaptées à l'étude des interactions entre des régions d'intérêt. De façon importante, le regroupement des DSB peut être étudié en 4C-seq. En effet, en utilisant une DSB comme point de vue, nous pouvons observer une augmentation des interactions de la DSB étudiée avec les autres DSB du génome (Figure 34a). Comme mentionné précédemment, nous avons pu déterminer dans une étude précédente les 80 DSB les mieux induites de notre système DivA (Clouaire et al., 2018). La quantification du signal de 4C-seq de chaque DSB utilisée comme point de vue avec les 79 autres DSB a permis de montrer une augmentation des interactions après induction de DSB, observée uniquement lorsqu'on utilise comme point de vue une DSB préférentiellement réparée par HR donc encline à se regrouper (Figure 34b). Comme attendu, aucune augmentation d'interaction n'est observée avec les DSB lorsqu'on utilise comme point de vue une région contrôle non endommagée, ce qui confirme la spécificité de notre analyse.

La réalisation de cette expérience de 4C-seq a ensuite été réitérée avant et après induction de DSB, mais cette fois dans les différentes phases du cycle cellulaire. En réalisant la même quantification que précédemment, mais en visualisant directement le ratio +DSB/-DSB dans les différentes phases du cycle, il apparaît que l'augmentation des interactions entre les DSB

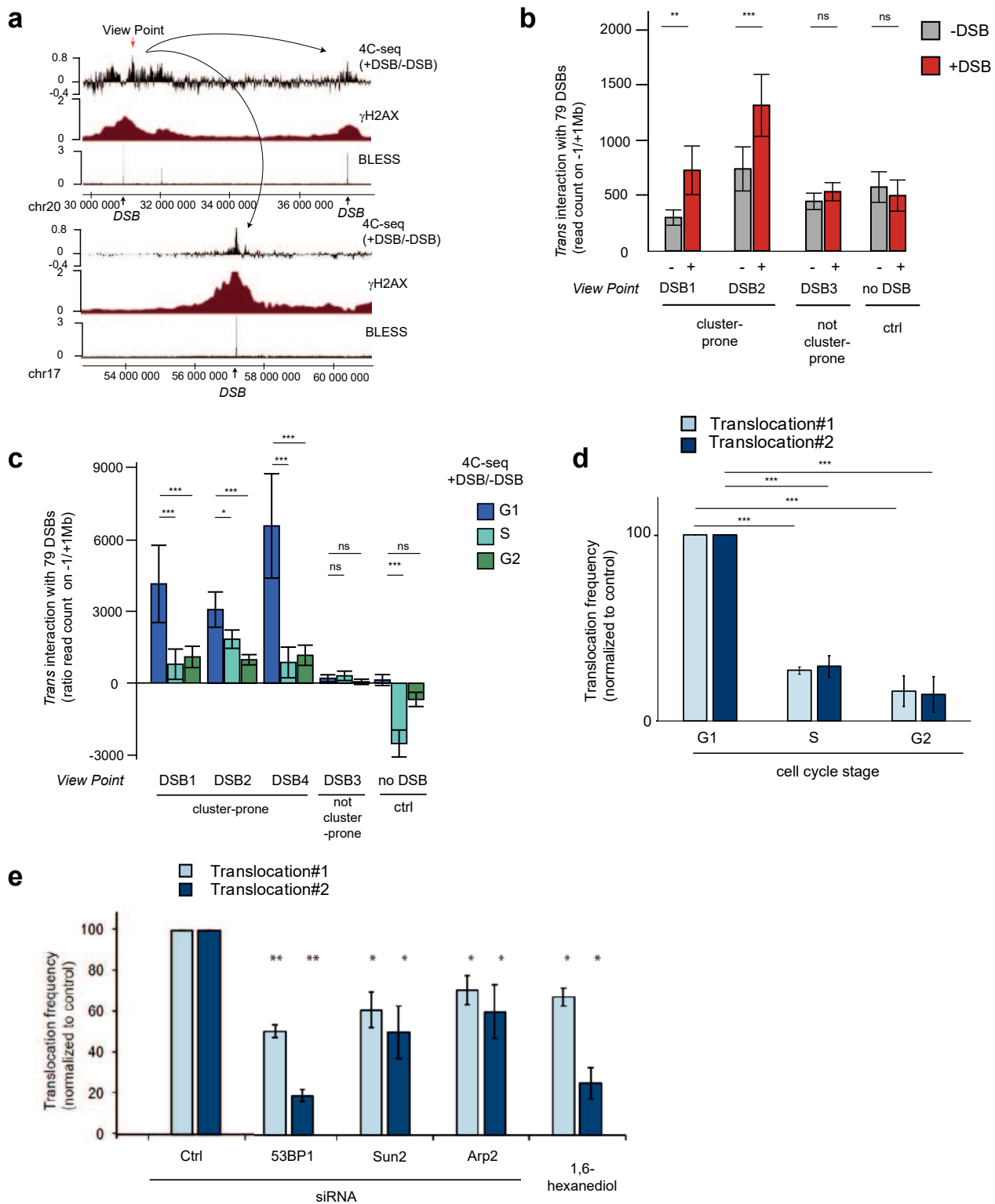


Figure 34: Corrélation entre le regroupement des DSB et la formation de translocations.

(a) Signal différentiel de 4C-seq (\log_2 ratio +DSB/-DSB) représentant un fragment du chromosome 20 et du chromosome 17 et avec un point de vue localisé sur une DSB du chromosome 20. Signal de ChIP-seq de γ H2AX et de BLESS (indique la position des DSB et leur niveau d'induction) sur les régions correspondantes. (b) Quantification des interactions entre le point de vue (trois DSB différentes ou une région contrôlée) avec les 80 DSB les plus induites (- la DSB du viewpoint) avant (-DSB) et après induction de DSB. (c) Quantification des interactions (\log_2 ratio +DSB/-DSB) entre le point de vue (quatre DSB différentes ou une région contrôlée) avec les 80 DSB les plus induites (- la DSB du viewpoint) dans les phases G1, S et G2 du cycle cellulaire. (d) Mesure de la fréquence de deux translocations après induction de DSB dans les phases G1, S et G2 du cycle cellulaire. $n > 3$. (e) Mesure de la fréquence de deux translocations après induction de DSB avant ou après déplétion de 53BP1, SUN2 ou ARP2 et avant ou après un traitement court de 1,6-hexanediol. $n > 3$

RÉSULTATS

enclines à se regrouper a lieu principalement dans les cellules en phase G1 du cycle cellulaire mais très peu dans les cellules en S ou en G2 (Figure 34c). Cela suggère que le rôle du regroupement des DSB ne serait pas majoritairement de la recherche d'homologie, qui a lieu, quant à elle, en G2 pour permettre la réparation par HR.

Enfin, tandis que le potentiel bénéfique du regroupement des DSB n'est pas encore clair, les conséquences de ce phénomène pourraient être très délétères pour les cellules. En effet, le regroupement des DSB conduisant à une juxtaposition des extrémités d'ADN de plusieurs DSB différentes, cela pourrait entraîner une religation illégitime entre ces DSB et donc à la formation de translocations. Nous avons donc mesuré la fréquence de translocations par qPCR avec une amorce ciblant une extrémité d'une DSB et une amorce ciblant une extrémité d'une autre DSB dans notre système DivA (Cohen et al., 2018). De façon intéressante, la fréquence de translocations est accrue en G1 par rapport aux phase S et G2 (Figure 34d). De plus, la déplétion des protéines 53BP1, SUN2 (complexe LINC) ou ARP2 (protéine du réseau d'actine), protéines précédemment identifiées comme potentialisant le regroupement des DSB (Aymard et al., 2017; Kilic et al., 2019; Schrank et al., 2018), entraîne une diminution de la fréquence de translocations (Figure 34e). Enfin un traitement court de 1,6-hexanediol, qui inhibe la séparation de phase et qui conduit à une inhibition du regroupement des DSB (Kilic et al., 2019), conduit également à une diminution de la fréquence de translocations.

L'ensemble de ces résultats témoignent d'une forte corrélation entre la capacité des TAD endommagés à se regrouper et la formation de translocations et suggère ainsi que le regroupement des DSB est un déterminant majeur de l'apparition de translocations.

E. La conformation initiale de la chromatine prédit quels gènes seront réprimés après l'apparition de DSB en *cis*

Enfin, comme mentionné en introduction, l'apparition d'une DSB dans ou proche d'un gène inhibe son expression. L'étude de nos données de RNA-seq avant et après induction de DSB a pu montrer que cette répression de la transcription peut également concerner des gènes qui sont présents dans les foyers de réparation mais à distance de la DSB, tandis que d'autres, plus proches de la DSB ne sont pas affectés. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la proximité spatiale initiale entre la DSB et un gène du TAD endommagé puisse expliquer que certains gènes soient réprimés en réponse aux DSB et d'autres non. En effet, des gènes qui sont distants linéairement de la DSB (par exemple ~700kb) mais qui interagissent initialement

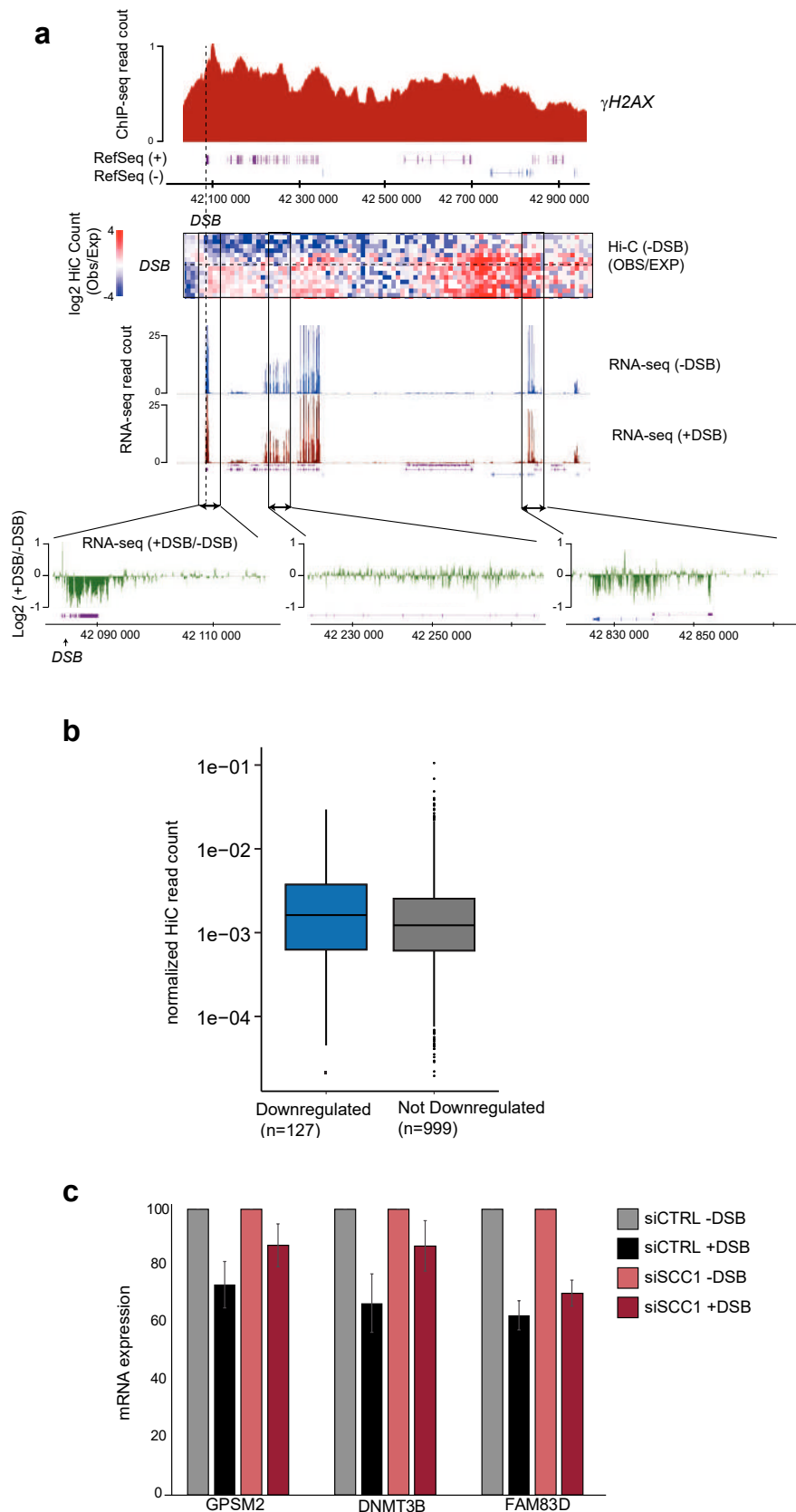


Figure 35: La conformation préexistante de la chromatine dicte la répression des gènes en réponse aux DSB.

(a) Signal de ChIP-seq de γ H2AX, signal de Hi-C avant induction de DSB (-DSB), signal de RNA seq avant (-DSB) et après induction de DSB (+DSB) et signal différentiel de RNA seq (\log_2 ratio +DSB/-DSB) dans une région comprise dans un foyer de réparation et proche d'une DSB. **(b)** Quantification du signal de 4C-seq avant induction de DSB entre les DSB des gènes significativement réprimés après induction de DSB ou non (déterminés par RNA-seq). **(c)** Quantification du niveau d'expression par RT-qPCR de gènes dans les foyers de réparation mais non endommagés avant et après induction de DSB et avant ou après déplétion de SCC1. $n=3$

RÉSULTATS

fortement avec le locus endommagé sont réprimés après induction de DSB (Figure 35a). Au contraire, un gène plus proche linéairement (par exemple ~100kb) mais interagissant initialement très peu avec la DSB n'est pas réprimé en réponse aux DSB. L'analyse de nos données de RNA-seq nous permet d'identifier des gènes significativement réprimés ou non au sein des TAD endommagés suite à l'induction des DSB. En accord avec nos observations précédentes (Figure 35a), les gènes réprimés suite à l'apparition de DSB montrent une interaction plus forte avec le locus endommagé, par comparaison avec les gènes dont la transcription n'est pas réprimée (Figure 35b).

La répression des gènes adjacents aux DSB a été montrée précédemment comme étant dépendante des cohésines (Meisenberg et al., 2019). De façon intéressante, la répression transcriptionnelle des gènes à distance de la DSB (mais proches spatialement) semble dépendre également des cohésines (Figure 35c). Des expériences de RNA-seq dans des cellules CTRL ou déplétées de SCC1 sont en cours de séquençage pour confirmer ce résultat.

L'ensemble de ces résultats indique que les régions d'ADN qui interagissent initialement fortement avec les DSB voient leur transcription réprimée par l'induction de DSB. De plus, nos données préliminaires suggèrent que les cohésines pourraient être impliquées dans cette répression transcriptionnelle.

3. Conclusion

En conclusion, cette étude en préparation a permis de montrer que les TAD sont une unité de la réponse chromatinienne aux DSB à différentes échelles. En effet, nous avons montré que suite à l'apparition de DSB dans le génome, l'ensemble des TAD du génome est renforcé. Ce renforcement des TAD est plus marqué dans les TAD endommagés et semble dépendre d'une accumulation des cohésines aux frontières de TAD.

D'autre part, nous avons montré que les TAD endommagés du génome peuvent se regrouper de façon indépendante des cohésines, conduisant à la formation de « TAD cliques », où plus de deux TAD endommagés interagissent ensemble. La formation de ces TAD cliques a lieu principalement dans les cellules en G1 et corrèle avec les niveaux de protéines couvrant les foyers de réparation (γ H2AX, 53BP1, Ubiquitinylation de la chromatine). 53BP1 étant impliquée dans la séparation de phase, le regroupement des DSB pourrait donc dépendre d'un mécanisme de séparation de phase, comme cela a été proposé par l'équipe de Matthias Altmeyer (Kilic et al., 2019). De plus, bien que les bénéfices de ce rapprochement spatial de

RÉSULTATS

TAD endommagés restent encore à être éclaircis, ce phénomène semble être à l'origine de la formation de translocations, évènement pouvant être à l'origine de cancers.

Enfin, nous avons montré que la conformation initiale de la chromatine est un élément clef dans l'inhibition de la transcription des gènes faisant suite à l'apparition de DSB. En effet, les gènes très proches de DSB dans l'espace du noyau sont réprimés suite à l'apparition de DSB, potentiellement de façon cohésine-dépendante.

DISCUSSION

DISCUSSION

Grâce à l'utilisation d'un système cellulaire dans lequel il est possible d'induire un nombre de cassures double-brin de l'ADN (DSB) constant et à des positions annotées du génome (DivA), et à la combinaison de technologies basées sur le séquençage à haut-débit telles que le Hi-C, le 4C-seq et la CHIP-seq, nous avons pu mettre en évidence un rôle majeur de la conformation de la chromatine dans la réparation des DSB.

En effet, nos données montrent que les TAD sont des unités fonctionnelles de la réparation des DSB à différentes échelles. D'une part, les TAD sont l'unité de base de la formation des foyers de réparation grâce à un mécanisme de loop extrusion unidirectionnel dépendant des cohésines, établi de chaque côté des DSB. D'autre part, l'apparition de DSB dans le génome provoque le renforcement des TAD endommagés (théâtre de l'apparition de DSB), phénomène concernant également le reste du génome non endommagé de façon plus modérée. Enfin, nous avons montré que les DSB sont capables de se regrouper en G1 à l'échelle des TAD entiers, conduisant ainsi à la formation de TAD cliques, phénomène décrivant le regroupement de plus de deux TAD endommagés, processus potentiellement à l'origine de la formation de translocations.

I. Le rôle de la loop extrusion dans la réparation des DSB

A. Le rôle de la loop extrusion dans l'établissement des foyers de réparation

A1. Etablissement rapide des foyers de réparation grâce aux cohésines

Notre première étude a permis de montrer que les TAD sont le support de la propagation de nombreux événements de signalisation des DSB tels que la phosphorylation de H2AX, en accord avec une étude récente (Collins et al., 2020), l'éviction de l'histone H1 et l'accumulation de 53BP1, MDC1 et de l'ubiquitinylation de la chromatine, permettant une signalisation des DSB à l'échelle du mégabase. Nos données suggèrent un événement de loop extrusion dépendant des cohésines et déclenché de part et d'autre de chaque DSB, qui permet la phosphorylation d'H2AX sur un TAD entier. Dans ce modèle, les cohésines s'accumulent rapidement aux DSB grâce à un mécanisme encore incertain (voir partie A2), conduisant à la formation de boucles de chromatine de chaque côté des DSB. Les processus de loop extrusion sont donc unidirectionnels car bloqués d'un côté par la DSB elle-même et/ou par la machinerie de réparation. ATM, qui est recrutée localement aux DSB, peut ainsi phosphoryler les

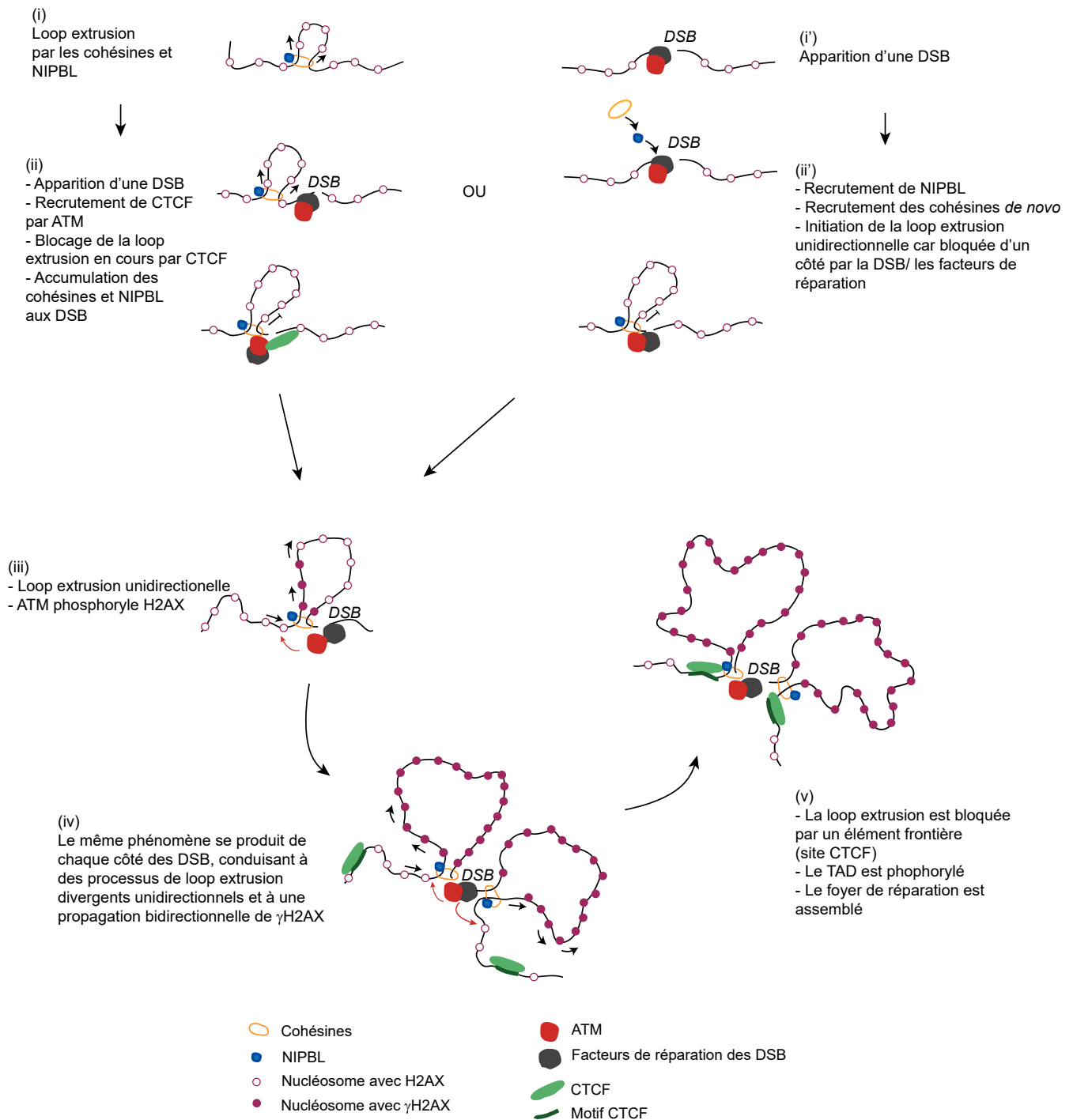


Figure 36 : Modèle. Le processus de loop extrusion médié par les cohésines assure l'établissement des foyers de réparation.

(i) Les phénomènes de loop extrusion par les cohésines et NIPBL se produisent en continu sur le génome. (ii) L'apparition de DSB provoque un blocage des processus de loop extrusion en cours, potentiellement grâce à un recrutement de CTCF, conduisant à une accumulation des cohésines et de NIPBL aux DSB. Une autre option est : (i') Apparition d'une DSB dans le génome. (ii') Recrutement de NIPBL puis des cohésines aux DSB grâce aux facteurs de réparation, puis création d'une nouvelle boucle de chromatine par les cohésines, qui est bloquée d'un côté par les DSB (mécanisme inconnu). (iii) Les cohésines bloquées d'un côté par la DSB, assurent une loop extrusion unidirectionnelle. ATM, qui est recrutée très localement aux DSB phosphoryle H2AX à mesure que les nucléosomes passent dans la boucle en cours d'extrusion. (iv) Le même processus se produit de chaque côté, permettant un phénomène de loop extrusion unidirectionnel et divergent, assurant un établissement bidirectionnel de γ H2AX. (v) La loop extrusion s'arrête (ou ralentit) lorsqu'elle rencontre des sites CTCF convergents fixés par l'insulateur CTCF. Puisque la vitesse de loop extrusion mesurée *in vitro* peut atteindre 0,5-2 kb/sec, ce mécanisme permet de phosphoryler H2AX sur un TAD entier en 10-30 min, permettant la mise en place rapide des foyers de réparation.

DISCUSSION

nucléosomes contenant H2AX lorsque la fibre de chromatine passe à proximité de la DSB à mesure que la boucle est extrudée. Lorsque les boucles en cours d'extrusion rencontrent des sites CTCF à l'intérieur d'un TAD, elles peuvent être ralenties ou arrêtées dans certaines cellules, conduisant à une accumulation plus forte de γ H2AX sur ces régions. Cela pourrait expliquer pourquoi les profils de γ H2AX sont irréguliers (avec des creux et des pics). Enfin, les boucles arrêtent d'être extrudées lorsque les cohésines rencontrent les sites CTCF des frontières de TAD, c'est-à-dire généralement des sites CTCF convergents (Figure 36).

Étant donné les estimations de vitesse de loop extrusion, qui suggèrent une processivité des cohésines de 0,5-2 kb par seconde *in vitro* (Davidson et al., 2019; Kim et al., 2019), un tel mécanisme permettrait l'assemblage des foyers de réparation de manière très rapide. En effet, l'ensemble du domaine chromatinien de l'ordre du mégabase serait modifié en environ 10-30 min, en accord avec le temps d'établissement des foyers γ H2AX mesuré dans des cellules (Rogakou et al., 1998).

En conclusion, nos données témoignent d'un rôle majeur des cohésines dans l'établissement de γ H2AX et donc de 53BP1, MDC1 et de l'ubiquitinylation de la chromatine, qui sont recrutées sur l'ensemble des domaines γ H2AX, en accord avec une étude précédente montrant un rôle important des cohésines dans l'établissement des foyers 53BP1 (Watrín and Peters, 2009).

A2. Recrutement des cohésines aux DSB

En accord avec des études précédentes, nous avons montré que le recrutement des cohésines aux DSB dépend de NIPBL, d'ATM et du complexe MRN (Kim et al., 2002; Unal et al., 2004). Cependant, il n'est pas connu si l'accumulation des cohésines aux DSB résulte d'un chargement des cohésines *de novo* aux DSB ou si elle résulte d'un blocage exercé par les DSB des processus de loop extrusion, qui ont naturellement lieu en continu sur le génome, ce qui conduirait à l'accumulation de cohésines sur les DSB. Dans un cas, cela signifierait qu'une boucle de chromatine est formée *de novo* aux DSB, tandis que dans l'autre cas, les DSB tireraient partie des phénomènes de loop extrusion déjà existants sur la chromatine pour établir des foyers de réparation (Figure 36).

NIPBL est connu comme étant responsable du chargement des cohésines sur l'ADN (Piché et al., 2019), ce qui favoriserait plutôt l'hypothèse d'un chargement *de novo* des cohésines aux DSB. Cependant, plus récemment il a été mis en évidence un rôle majeur de NIPBL dans le processus de loop extrusion, indépendamment de son rôle de chargement initial des

DISCUSSION

cohésines sur l'ADN. *In vitro*, NIPBL progresse à la base des boucles de chromatine avec les cohésines durant le processus de loop extrusion (Davidson et al., 2019). Ainsi, il serait également possible que NIPBL favorise le recrutement des cohésines aux DSB grâce à son rôle dans la loop extrusion.

De façon intéressante, plusieurs études ont démontré un recrutement de CTCF aux DSB de façon dépendante d'ATM (Han et al., 2017; Hilmi et al., 2017; Hwang et al., 2019; Lang et al., 2017). Quelle que soit l'hypothèse expliquant le recrutement des cohésines aux DSB, la présence de CTCF aux DSB pourrait expliquer leur comportement d'élément frontière, nécessaire à la mise en place d'un processus de loop extrusion unidirectionnel de part et d'autre des DSB afin d'établir les domaines γ H2AX. Une implication de CTCF dans ces processus de loop extrusion ancrés aux DSB pourrait également expliquer l'importance de CTCF dans l'établissement des foyers γ H2AX, observée dans d'autres laboratoires (Collins et al., 2020; Natale et al., 2017).

Enfin, l'implication d'ATM dans l'accumulation des cohésines aux DSB pourrait être expliquée par son rôle dans le recrutement de CTCF (Lang et al., 2017), ce qui favoriserait plutôt l'hypothèse d'un blocage des processus de loop extrusion en cours plutôt qu'un recrutement des cohésines *de novo* aux DSB. Le rôle du complexe MRN dans le recrutement des cohésines aux DSB, quant à lui, pourrait être médié par son rôle de recrutement et d'activation d'ATM aux DSB (Blackford and Jackson, 2017).

B. Rôle de la loop extrusion dans la réparation des DSB

B1. Rôle de la loop extrusion dans les mécanismes de réparation des DSB

De façon intéressante, le recrutement des cohésines et la mise en place d'un processus de loop extrusion aux DSB sont réalisés sur les DSB sujettes à une réparation par HR comme par NHEJ. Or, une étude précédente du laboratoire démontrait une accumulation plus importante de γ H2AX, 53BP1 et d'ubiquitinylation ainsi qu'une éviction plus importante de H1 sur les DSB réparées préférentiellement par HR (Clouaire et al., 2018).

L'étude de la reformation des TAD après la dégradation de SCC1 puis de sa réexpression indique que les régions transcriptionnellement actives du génome se réorganisent plus rapidement en TAD que des régions inactives (Rao et al., 2017), suggérant que les processus de loop extrusion pourraient être plus dynamiques dans les régions actives du génome. Or,

DISCUSSION

les DSB euchromatiniennes réparées préférentiellement pas HR sont les DSB qui surviennent majoritairement dans des régions actives du génome (Aymard et al., 2014; Pfister et al., 2014). Une hypothèse intéressante serait que le processus de loop extrusion mis en place aux DSB réparées par HR soit mis en place plus rapidement, conduisant à une accumulation plus importante des protéines constituant les foyers de réparation. Une autre possibilité serait que les DSB réparées par HR soient plus persistantes, comparées aux DSB réparées de façon plus rapide par NHEJ, et qu'elles aient donc plus de temps pour accumuler une plus grande quantité de γ H2AX.

De façon importante, la propagation très rapide des protéines constituant les foyers de réparation sur des TAD entiers, et notamment autour des DSB réparées par HR, pourrait modifier les propriétés de la fibre de chromatine, telles que sa mobilité dans le noyau (voir partie III).

B2. Rôle de la loop extrusion dans la répression des gènes en *cis*

Comme mentionné en introduction, les gènes endommagés et certains gènes proches des DSB subissent une inhibition de la transcription nécessaire à la réparation des DSB et dépendante des cohésines (Meisenberg et al., 2019). Notre laboratoire avait précédemment mis en évidence un rôle essentiel des cohésines dans la protection de certains gènes proximaux des DSB en empêchant γ H2AX de se propager sur ces gènes et en maintenant leur niveau de transcription (Caron et al., 2012; Iacovoni et al., 2010). Il était alors proposé que les cohésines formeraient une boucle de chromatine contenant les gènes actifs, leur permettant d'être isolés de la chromatine endommagée. Cependant, les facteurs déterminant le choix des gènes proximaux qui sont réprimés ou qui sont au contraire protégés demeuraient inconnus.

Nos travaux ont permis de compléter ces résultats en montrant que les gènes actifs qui sont présents dans un TAD contenant une DSB mais qui interagissent initialement peu avec cette dernière ont un niveau de transcription maintenu. A l'inverse, des gènes actifs, qui interagissent initialement fortement avec le site endommagé, subissent une forte inhibition de la transcription, et ce, même s'ils sont distants linéairement d'une DSB (par exemple à 700 kb d'une DSB, Figure 35a). D'après les études précédentes de notre laboratoire et du laboratoire de Jessica Downs (Meisenberg et al., 2019), ainsi que nos résultats préliminaires, il semble que les cohésines jouent un rôle majeur dans ces deux événements.

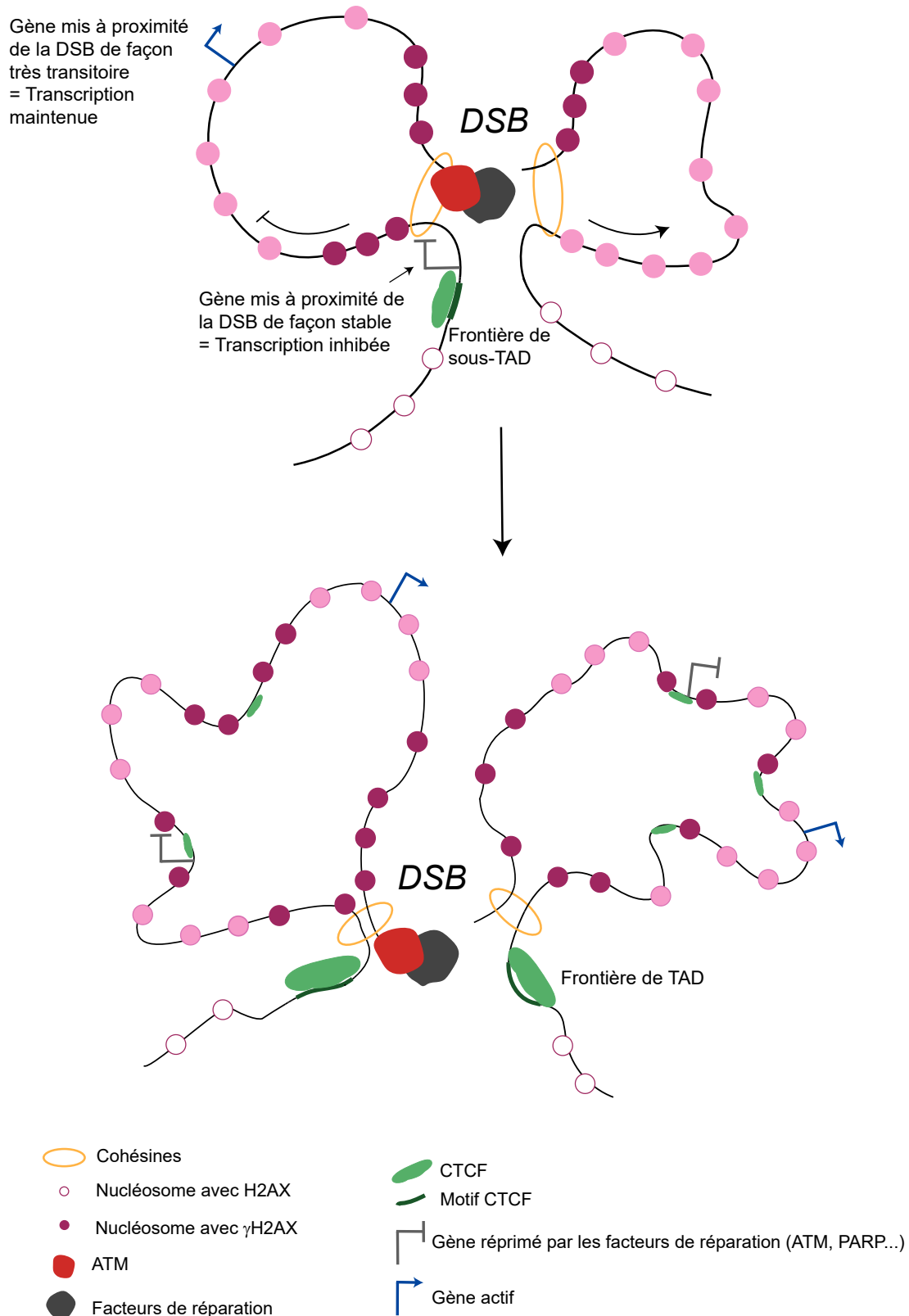


Figure 37 : Modèle. Les gènes en *cis* proches des frontières de sous-TAD sont réprimés alors que les autres gènes en *cis* ont un niveau de transcription maintenu.

Durant le processus de loop extrusion unidirectionnel mis en place de part et d'autres des DSB, la DSB est mise à proximité transitoirement de régions d'ADN qui auront un niveau de transcription maintenu et une faible quantité de nucléosomes phosphorylés. Lorsque le processus de loop extrusion est ralenti (ou totalement arrêté dans certaines cellules) par la présence de sites CTCF (principalement les sites qui ont une orientation qui pointe vers la DSB), la DSB sera en contact prolongé des régions d'ADN proches des sites CTCF. Ces régions accumuleront plus de phosphorylation sur H2AX et subiront une inhibition de la transcription (ATM ou PARP dépendante).

DISCUSSION

L'ensemble de ces données, associées à la découverte du rôle de la loop extrusion dans la formation des boucles de chromatine, permettent de proposer un modèle plus dynamique que le modèle précédemment proposé. En effet, il est possible d'imaginer que le processus de loop extrusion unidirectionnel, mis en place de part et d'autre de chaque DSB, permette la phosphorylation d'H2AX et l'inhibition des gènes actifs plus fortement dans les zones où le processus de loop extrusion est ralenti (ou arrêté dans certaines cellules), c'est-à-dire là où la loop extrusion est stoppée par des frontières de sous-TAD. A l'inverse, les régions que l'anneau de cohésines rencontre de façon plus transitoire grâce à un phénomène de loop extrusion plus rapide, ont un niveau de γ H2AX plus faible et une transcription maintenue (Figure 37). Des données de RNA-seq après induction de DSB et déplétion ou non de SCC1, ainsi que l'analyse de la position des sites CTCF par rapport aux gènes réprimés devraient permettre de tester la validité de ce modèle.

B3. Rôle de la loop extrusion dans la CSR et dans la V(D)J

Concernant des DSB produites de façon endogène lors de la recombinaison V(D)J ou lors de la commutation isotypique (CSR), l'organisation 3D de l'ADN, et notamment la loop extrusion jouent un rôle majeur dans la réparation de ces dernières (Barajas-Mora et al., 2019; Guo et al., 2011; Jain et al., 2018; Rocha et al., 2016; Zhang et al., 2019a, 2019b). Ces deux processus permettant de générer des anticorps très divers, sont basés sur la production de DSB puis sur la recombinaison entre plusieurs régions d'ADN.

Ainsi, dans ce contexte il existe un phénomène de loop extrusion unidirectionnel, car bloqué d'un côté par le complexe de recombinaison ou la transcription, qui permet de mettre à proximité les deux régions destinées à être clivées puis recombinées ensemble, conduisant à une recombinaison entre ces-dernières (Zhang et al., 2019, Zhang et al., 2019). La question se posait de quels sites parmi les nombreuses combinaisons possibles allaient être utilisés pour réaliser la recombinaison. De façon intéressante, des sites de recombinaison possibles localisés près d'une frontière marquée par CTCF, auront plus de chance d'être le site choisi pour la recombinaison car le processus de loop extrusion s'y arrête plus longtemps car bloqué par CTCF, juxtaposant ainsi plus longtemps les deux régions qui pourront être réarrangées ensemble. Ceci expliquerait pourquoi certains sites sont préférentiellement choisis par rapport à d'autres dans les recombinaisons ayant lieu durant la V(D)J et la CSR.

C. Le rôle de la loop extrusion dans le dépôt d'une marque d'histone

De façon intéressante, notre étude sur le rôle de la loop extrusion dans l'établissement des domaines γ H2AX pourrait avoir des répercussions sur la compréhension de l'établissement des marques de la chromatine. En effet, nos travaux ont mis en évidence pour la première fois le potentiel du processus de loop extrusion dans le dépôt d'une marque d'histone.

Dans certains contextes, les frontières de TAD corrélient avec les frontières de domaines enrichis en certaines marques d'histones (Dixon et al., 2012; Narendra et al., 2015; Noordermeer et al., 2011; Nora et al., 2012; Sexton et al., 2012). Par exemple, chez les mammifères, les domaines enrichis en marques d'histones répressives telles que H3K9me3, H3K9me2 ou H3K27me3 semblent restreints par les frontières de TAD (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012). De plus, chez la drosophile, il existe une forte corrélation entre les diverses marques de chromatine et les domaines d'interactions (Sexton et al., 2012). Néanmoins, le lien de causalité entre la formation des TAD et le dépôt des marques d'histones est encore à ce jour incertain.

Une hypothèse intéressante serait que le phénomène de loop extrusion, dans des conditions où l'ADN n'est pas endommagé, puisse également établir certaines marques d'histones sur des TAD entiers. En accord avec cette hypothèse, une délétion des sites CTCF dans les clusters de gènes Hox, qui sont hautement régulés au cours du développement, conduit à une expansion du domaine H3K4me3 (marque d'histone active) sur un domaine normalement enrichi en marques répressives. Ces résultats indiquent que les frontières de TAD pourraient restreindre la propagation de certaines marques d'histones en stoppant le processus de loop extrusion dépendant des cohésines.

II. Effet de la présence de cassures double-brin sur la structure tridimensionnelle du génome

A. Renforcement des TAD en réponse aux DSB

De façon importante, nos travaux ont mis en évidence une augmentation des interactions dans les TAD endommagés et une diminution des interactions entre les TAD endommagés et leurs TAD adjacents. Ces événements sont le signe d'un renforcement des TAD endommagés suite

DISCUSSION

à l'apparition de dommages. De plus, ce renforcement des TAD endommagés est dépendant de l'augmentation du recrutement des cohésines sur leurs frontières.

De façon intéressante, notre étude montre une augmentation du recrutement des cohésines aux frontières de TAD sur le reste du génome non endommagé, associée à un renforcement des TAD non endommagés. Néanmoins le renforcement des TAD non endommagés est moins prononcé que le renforcement des TAD endommagés.

Un renforcement des TAD à l'échelle du génome entier a également été observé après un traitement aux irradiations par le laboratoire de Rachel Patton McCord dans une étude encore non publiée (Sanders et al., 2019 BioRxiv). Néanmoins, l'induction de DSB par irradiations ne permet pas de connaître la position des DSB sur le génome, qui est aléatoire. Ainsi, cette étude ne permettait pas de comprendre si le renforcement des TAD se produisait à l'échelle du génome entier ou s'il ne concernait que les TAD endommagés.

Enfin, il est possible que le renforcement des TAD endommagés corresponde à ce qui a été observé en microscopie à haute-résolution par le laboratoire de Jiri Lukas, c'est-à-dire à une compaction des foyers de réparation/TAD endommagés, visualisée par l'organisation circulaire qu'adoptent les foyers de réparation en se repliant sur eux-mêmes (Ochs et al., 2019). En effet, une augmentation des contacts à l'intérieur des TAD et une diminution des contacts avec les TAD adjacents pourraient potentiellement être visualisées en microscopie par une compaction du TAD sur lui-même. De plus, ces deux phénomènes observés par des approches orthogonales dépendent des cohésines et sont indépendants du mécanisme de réparation préférentiellement utilisé (HR ou NHEJ).

B. Les causes du renforcement des TAD

Le renforcement des TAD endommagés et non endommagés induits suite à l'apparition de DSB dans le génome dépend, au moins en partie, d'un recrutement plus important des cohésines sur les sites CTCF. Cependant, il reste à comprendre ce qui contribue à cette accumulation des cohésines en réponse aux DSB.

Le renforcement des TAD endommagés étant plus marqué que celui des TAD non endommagés, il serait tentant d'imaginer une signalisation qui partirait de chaque DSB et diffuserait sur le reste du chromosome endommagé, conduisant à une accumulation des cohésines sur l'ensemble du génome. Néanmoins, le renforcement des TAD non endommagés, tout comme le recrutement accru des cohésines, ne sont pas corrélés au

DISCUSSION

nombre de DSB présentes sur les chromosomes, signifiant que le renforcement des TAD à l'échelle du génome entier ne semble pas être dû à un signal qui serait initié aux DSB et qui diffuserait en *cis*. Ce résultat soulève la possibilité de l'existence de deux mécanismes différents permettant pour l'un, une accumulation des cohésines spécifiquement sur les TAD endommagés, et pour l'autre, une accumulation des cohésines sur le reste du génome.

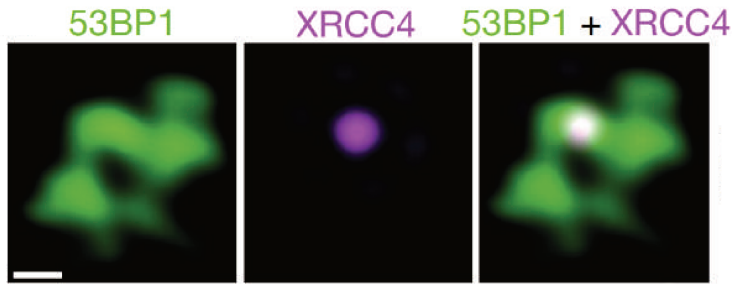
D'après l'étude du laboratoire de Rachel Patton McCord, le renforcement des TAD en réponse aux DSB est médié par la kinase ATM. Néanmoins, comme mentionné précédemment, l'induction de DSB par irradiations ne permet pas de comprendre si l'implication d'ATM dans le renforcement des TAD concerne les TAD endommagés ou non endommagés. Il serait alors nécessaire de réaliser une expérience de Hi-C après induction de DSB et inhibition d'ATM dans le système DivA, ce qui permettrait probablement de comprendre si ATM est impliquée dans le renforcement des TAD endommagés et/ou dans le renforcement de la conformation du reste du génome.

Que ce soit concernant le renforcement des TAD endommagés ou non, l'accumulation des cohésines sur les sites CTCF et donc sur les frontières de TAD pourrait être dû à un ou plusieurs facteurs tels qu'une augmentation du chargement des cohésines sur l'ADN et/ou à une modification des propriétés des cohésines, telles que leur processivité sur l'ADN ou la stabilité de leur liaison à l'ADN.

B1. Renforcement des TAD endommagés

De façon intéressante, nous avons montré que les cohésines phosphorylées P-SMC1 S966 et P-SMC3 S1083 sont enrichies sur les sites de fixation des cohésines de l'ensemble des TAD endommagés. De plus, ces modifications post-traductionnelles des cohésines sont effectuées par ATM (Kim et al., 2002). Or, il a été montré que ces modifications participent à l'accumulation des cohésines sur leurs sites de fixation après induction de dommages par irradiation, et que leur absence entraîne une diminution de la mobilité des cohésines, analysée à l'aide d'expériences de FRAP (Bauerschmidt et al., 2011; Kim et al., 2010). De plus, il est possible que la phosphorylation des cohésines puisse moduler leur processivité lors du processus de loop extrusion puisque les sites de phosphorylation sont proches des sites d'hydrolyse d'ATP des protéines SMC1 et SMC3 (Kim et al., 2010). Un mécanisme possible du renforcement des TAD endommagés pourrait donc être qu'ATM phosphorylerait les cohésines sur un TAD entier durant le processus de loop extrusion mis en place de part et d'autre des DSB, conduisant ainsi à l'augmentation de la mobilité des cohésines sur l'ADN,

a

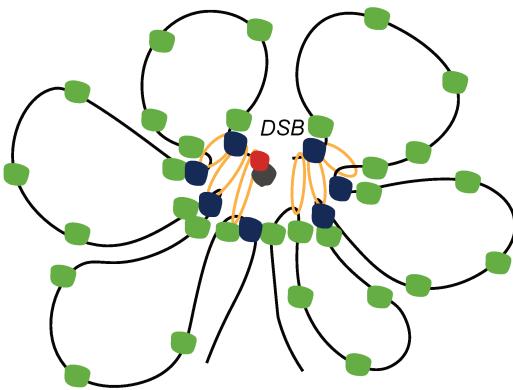


Ochs et al., 2019

= ?

b

+ de Cohésines
+ d'interactions intra-TAD
=
DSB isolée du reste du génome



c

+ de séparation de phase intra-TAD (53BP1 et/ou RIF1)
+ d'interactions intra-TAD
=
DSB isolée du reste du génome

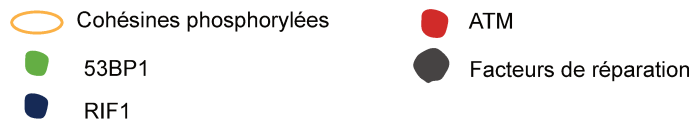
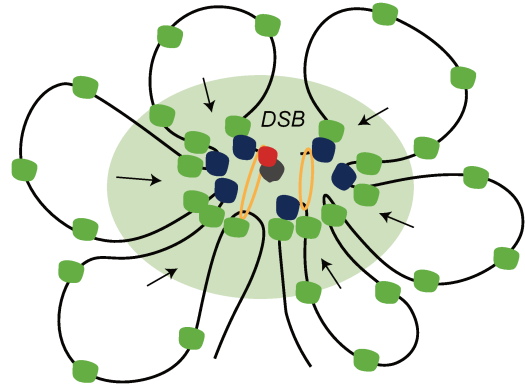


Figure 38 : Modèle. Le renforcement des TAD pourrait conduire à l'isolement de la DSB au centre du TAD endommagé.

(a) Microscopie à haute-résolution représentant l'organisation des foyers de réparation (marqués grâce à 53BP1) autour des DSB (visualisées grâce au marquage XRCC4) (Ochs et al., 2019). Cette organisation pourrait correspondre à un renforcement des TAD endommagés permettant d'isoler la DSB du reste du génome. (b) Ce phénomène pourrait être expliqué par les processus de loop extrusion renforcés partant des DSB et/ou (c) par un phénomène de séparation de phase exercé par 53BP1, qui est propagé sur un TAD entier grâce à la loop extrusion dépendante des cohésines ou par RIF1, qui semble être présent aux frontières de sous-TAD.

DISCUSSION

qui s'accumuleraient donc plus rapidement et donc potentiellement plus longtemps sur les sites CTCF.

Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences de Hi-C et de ChIP-seq contre les cohésines dans le système DivA contenant des formes sauvages ou phospho-mutantes de SMC1 et SMC3.

Enfin une autre hypothèse, non exclusive, serait que le renforcement des TAD endommagés que nous avons observé correspondrait à la compaction des domaines de réparation mis en évidence par le laboratoire de Jiri Lukas, et pourrait alors dépendre de la protéine RIF1. RIF1 est un co-facteur de 53BP1 et possède, en plus de son rôle d'inhibition de la résection, un rôle dans l'organisation 3D du génome. En effet, il est impliqué, d'une part, dans la circularisation des foyers de réparation mentionnée précédemment en se positionnant entre les différents sous-TAD couverts par γ H2AX et 53BP1 (Ochs et al., 2019). D'autre part il est impliqué dans la régulation du « replication timing » en inhibant des contacts entre des domaines répliqués à des moments différents de la phase S (Foti et al., 2016). Sa localisation aux frontières entre les sous-TAD observée après irradiations et son rôle d'inhibition des contacts entre différents domaines de réplication suggèrent un rôle d'insulation de RIF1, tout comme CTCF. Si le rôle éventuel d'insulateur de RIF1 est confirmé, son recrutement aux frontières de TAD endommagés pourrait participer à l'accumulation des cohésines aux frontières de TAD, conduisant à un renforcement des TAD endommagés (Figure 38).

D'autre part, 53BP1 étant recruté sur un TAD endommagé entier et possédant un rôle dans la séparation de phase (Kilic et al., 2019), il serait possible que le repliement des foyers de réparation sur eux-mêmes dépende en partie d'un phénomène de séparation de phase en *cis*, à l'intérieur d'un foyer de réparation (Figure 38). RIF1 étant un co-facteur de 53BP1, une autre possibilité serait que ce soit RIF1 qui ait un rôle dans la séparation de phase. En effet, des expériences d'immunofluorescence non publiées réalisées au laboratoire montrent qu'un traitement court d'1,6-hexanediol (inhibiteur de la séparation de phase) inhibe la formation des foyers RIF1 autour des DSB mais pas des foyers 53BP1, indiquant qu'un phénomène de séparation de phase exercé par RIF1 pourrait contribuer à son accumulation autour des DSB (Figure 39).

Pour tester ces hypothèses, il serait intéressant de réaliser une expérience de Hi-C et de ChIP-seq contre les cohésines avant et après induction de DSB dans des cellules déplétées de 53BP1 ou de RIF1 (Ochs et al., 2019).

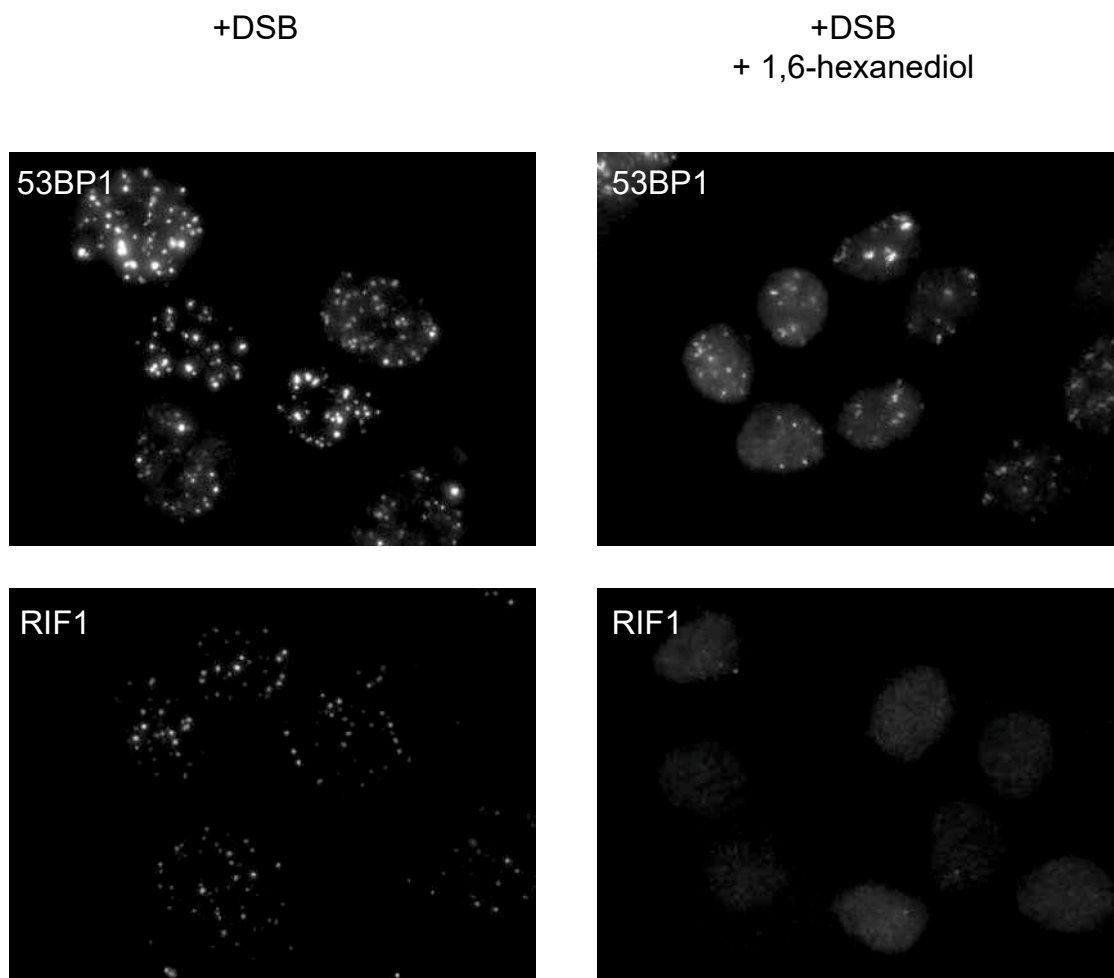


Figure 39 : Les foyers RIF1 semblent être assemblés par séparation de phase.

Immunofluorescence contre 53BP1 ou RIF1 réalisée après induction de DSB dans le système DivA avant ou après un traitement de 3min d'1,6-hexanediol (inhibiteur de la séparation de phase).

Tandis que les foyers 53BP1 ont une structure différente mais s'accumulent correctement autour des DSB, les foyers RIF1 ne sont pas établis après l'inhibition de la séparation de phase.

B2. Renforcement des TAD non endommagés

Comme mentionné précédemment, il semble qu'un mécanisme spécifique soit mis en place pour contribuer au renforcement des TAD du génome entier suite à l'apparition de DSB dans le génome. Ce mécanisme semble être propagé à l'échelle du noyau afin de renforcer l'architecture du génome entier.

L'accumulation des cohésines sur les frontières de TAD pourrait résulter, tout comme pour les TAD endommagés, d'une modification des cohésines et de leurs propriétés et/ou d'une augmentation de la fixation de CTCF aux frontières de TAD.

Il serait intéressant d'étudier l'enrichissement de CTCF aux frontières de TAD en réponse aux DSB par CHIP-seq. En effet, un enrichissement de CTCF aux frontières de TAD pourrait contribuer à un blocage plus important des cohésines aux frontières de TAD et donc à leur accumulation.

D'autre part, nos données de CHIP-seq n'ont pas permis de montrer une augmentation de la phosphorylation des cohésines en dehors des TAD endommagés. Néanmoins il existe d'autres modifications des cohésines telles que leur acétylation par ESCO1, également impliquée dans le renforcement des cohésines sur ses sites de fixation après irradiations (Kim et al., 2010). Il serait intéressant d'étudier cette modification des cohésines par CHIP-seq dans le système DlvA afin de comprendre sur quels domaines elle est enrichie en réponse aux DSB.

Enfin, ce phénomène ayant lieu à l'échelle du noyau entier, il serait intéressant de comprendre quel(s) acteur(s) conduisent à cette signalisation. Les protéines impliquées dans les checkpoints pourraient être des candidats potentiels puisqu'ils sont impliqués dans la signalisation des DSB à l'échelle du noyau entier (Pietenpol and Stewart, 2002). Par exemple, chez la levure, les checkpoints sont impliqués dans la mobilité du génome entier suite à l'apparition de dommages, illustrant le fait que les checkpoints peuvent moduler le génome entier en réponse aux DSB (Seeber et al., 2013).

C. Les rôles possibles du renforcement des TAD

D'une part, le renforcement des TAD endommagés pourrait permettre de renforcer encore davantage la phosphorylation d'H2AX grâce à une dynamique plus importante des contacts intra-TAD. En effet, en plus du phénomène de loop extrusion mis en place de part et d'autre des DSB pour établir γ H2AX, un renforcement global des interactions pourrait permettre un établissement des foyers de réparation encore plus rapide.

DISCUSSION

D'autre part, un renforcement des TAD pourrait contribuer à isoler la DSB du reste du génome non endommagé, protégeant ainsi le génome de toute la machinerie de réparation qui intervient aux DSB.

Une autre hypothèse serait que si le renforcement des TAD correspond effectivement à la compaction des foyers de réparation observée par le laboratoire de Jiri Lukas, le renforcement des TAD endommagés pourrait protéger la DSB en la maintenant éloignée du reste du génome. Cela permettrait de réguler l'étape de résection qui a lieu aux DSB (Ochs et al., 2019). Or, une étude encore non publiée a démontré qu'une résection excessive peut être délétère pour les cellules puisqu'elle conduit à un défaut de réparation et à une diminution de la prolifération des cellules (Berg et al., 2019 BioRxiv), démontrant l'importance de réguler finement le processus de résection. De plus, si ce phénomène dépend de la séparation de phase, il pourrait permettre de créer un compartiment de réparation dans lequel les protéines de réparation sont concentrées.

Enfin, un renforcement de l'architecture du génome entier et plus particulièrement de l'inhibition des contacts entre différents TAD pourrait permettre d'inhiber les contacts entre différentes DSB d'un même chromosome, limitant ainsi la probabilité d'apparition de réarrangements chromosomiques. En accord avec cette hypothèse, un séquençage d'exome de cellules humaines a mis en évidence un rôle important des cohésines dans l'inhibition de réarrangements chromosomiques (insertions, délétions, duplications, translocations), et ce même en absence d'induction de dommages (Gelot et al., 2016).

III. Le regroupement des cassures double-brin de l'ADN

Le regroupement des DSB est un phénomène encore mal compris. La compréhension fine du mécanisme permettant ce regroupement pourrait permettre de mieux comprendre ses fonctions éventuelles. Tandis qu'il existait des études contradictoires quant à la phase du cycle cellulaire dans laquelle a lieu le regroupement des DSB (Aten, 2004; Aymard et al., 2017; Schrank et al., 2018), nos travaux ont permis de montrer que ce processus est majoritairement observé durant la phase G1. D'autre part, nous avons pu confirmer que le regroupement des DSB en G1 concerne principalement les DSB préférentiellement réparés par HR.

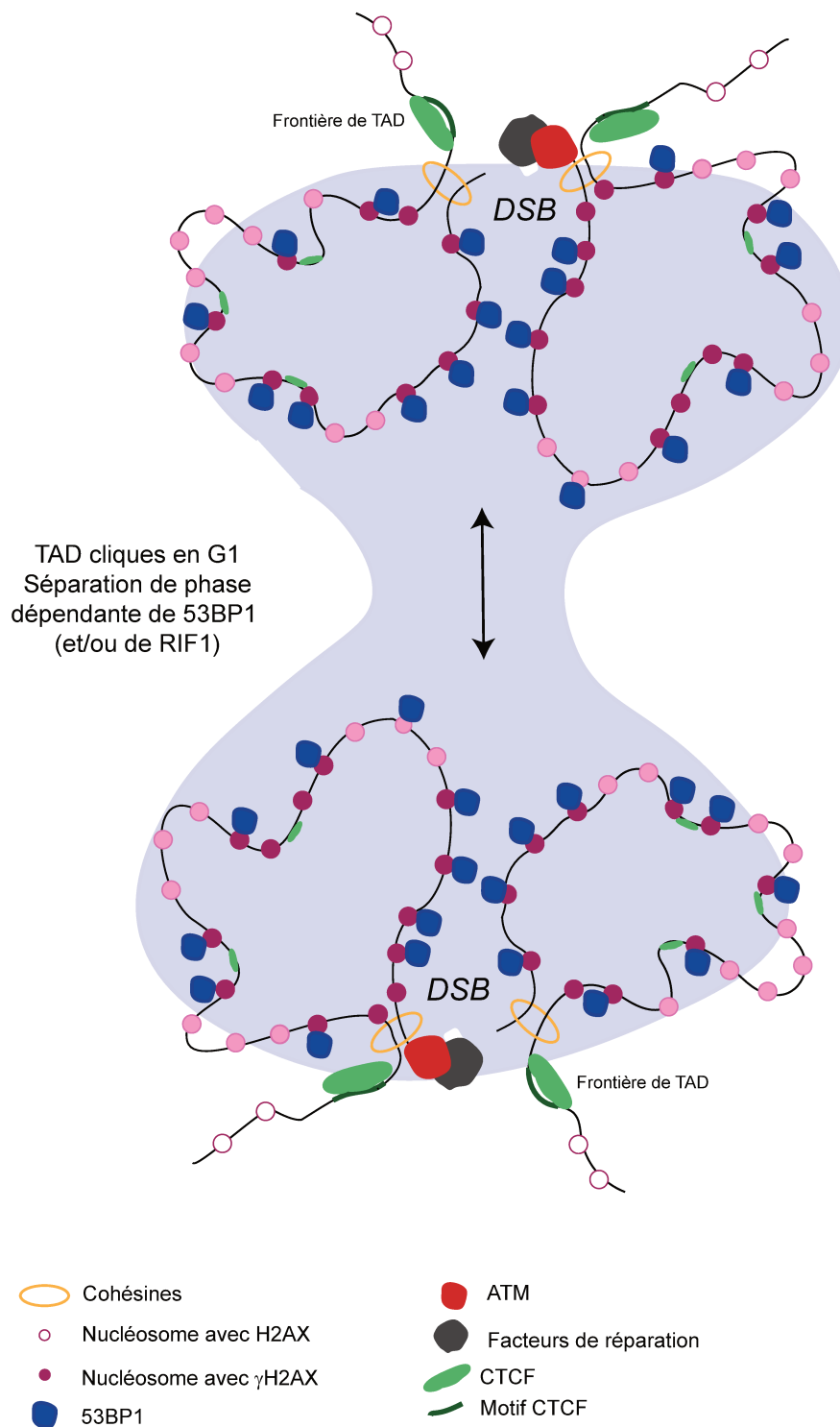


Figure 40 : Modèle. Le regroupement des TAD endommagés en G1 pourrait dépendre de la séparation de phase médiée par 53BP1 (et/ou RIF1).

Le processus de loop extrusion ancré aux DSB permet la phosphorylation de γ H2AX par ATM sur des TAD entiers. 53BP1 se fixe sur les domaines γ H2AX (via MDC1 puis l'ubiquitinylation de la chromatine et grâce à H4K20me2). A cause de la dilution de H4K20me2 lors de la réplication, 53BP1 est davantage recruté aux DSB en G1. Grâce à ses propriétés guidant la séparation de phase, 53BP1 entraîne un regroupement des TAD endommagés en G1.

A. Le regroupement des DSB à l'échelle des TAD : formation de TAD cliques

Notre étude a permis de montrer pour la première fois que ce sont les TAD endommagés entiers qui se regroupent au sein du noyau, conduisant à la formation de TAD cliques. Les TAD cliques correspondent à l'interaction de plus de deux TAD entre eux (Paulsen et al., 2019). Or, nos expériences de Hi-C ont permis de révéler jusqu'à six TAD endommagés par TAD cliques. Des expériences de Hi-C ou de DNA-FISH en cellule unique seraient néanmoins nécessaires pour confirmer (ou infirmer) le regroupement de ces multiples TAD dans un même foyer.

De façon intéressante, la quantité de TAD endommagés qui sont impliqués dans un phénomène de TAD cliques est corrélée à la quantité de γ H2AX, de 53BP1 et de chromatine ubiquitinylée sur ces TAD. ATM étant responsable de la phosphorylation de H2AX autour des DSB « propres » (Caron et al., 2015), il est possible que son rôle précédemment rapporté dans le regroupement des DSB (Aten, 2004; Caron et al., 2015) soit médié par 53BP1. En effet, 53BP1 reconnaît et se fixe sur la chromatine ubiquitinylée, elle-même présente sur l'ensemble du domaine γ H2AX. De façon importante, sachant que le regroupement des DSB dépend de la quantité de ces protéines des foyers de réparation, cela fournit pour la première fois un exemple de l'importance de la propagation de ces protéines sur un si large domaine de chromatine. Ainsi, le rôle de γ H2AX dans la réparation pourrait dépendre en partie de son rôle dans la formation de ces TAD cliques.

B. Le regroupement des DSB dépend-il de la séparation de phase ou d'une mobilité active ?

Plusieurs observations suggèrent que le regroupement des DSB pourrait dépendre d'un phénomène de séparation de phase. En effet, 53BP1 possède des caractéristiques de protéine guidant la séparation de phase (Kilic et al., 2019). Or, nous avons montré que la proportion de TAD cliques coïncide avec des niveaux de 53BP1 élevés. De plus, 53BP1 étant davantage recruté à la chromatine en G1 (Clouaire et al., 2018), cela pourrait expliquer pourquoi le regroupement des DSB a majoritairement lieu en G1 (Figure 40). Enfin, comme mentionné en introduction, les DSB pourraient se regrouper grâce à la parylation, la protéine FUS ou la protéine HP1, recrutées aux DSB et ayant été impliquées dans des phénomènes de séparation de phase (Altmeyer et al., 2015; Larson et al., 2017; Patel et al., 2015; Singatulina et al., 2019; Strom et al., 2017).

DISCUSSION

Néanmoins, de nombreuses études témoignent d'un rôle important du squelette cellulaire et nucléaire, ainsi que du complexe LINC dans la mobilité et dans le regroupement des DSB, indiquant que plutôt que de dépendre d'un mouvement passif de séparation de phase, le regroupement des DSB pourrait être un évènement hautement contrôlé, directionnel et actif. Par exemple, la formation de filaments d'actine ou de microtubules dans le noyau pourrait guider le mouvement des DSB les unes vers les autres, de la même façon que les filaments d'actine nucléaire guident les DSB hétérochromatiniennes vers les pores nucléaires chez la drosophile (Caridi et al., 2018). D'autre part, l'actine et la tubuline pourraient affecter la mobilité et potentiellement le regroupement des DSB depuis le cytoplasme, grâce au complexe LINC, qui transmet les forces du squelette cytoplasmique au squelette nucléaire et donc indirectement à la chromatine. Néanmoins, des études supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre les mécanismes mis en jeu.

Il serait également nécessaire de comprendre comment réconcilier ces différentes études quant au mécanisme de regroupement des DSB par séparation de phase ou par mobilité active afin de comprendre son rôle dans la réparation.

Chez la levure, la séparation de phase exercée par Rad52, protéine très importante dans la HR, permet d'accumuler de la tubuline et d'ainsi établir un trajet direct via les microtubules vers la périphérie nucléaire, environnement favorable à la réparation chez la levure (Oshidari et al., 2020). Une hypothèse serait donc que le squelette nucléaire potentialise/accélère le regroupement passif des DSB grâce à une mobilité directive.

Enfin, une autre hypothèse serait que certains TAD endommagés se regroupent grâce à un phénomène de séparation de phase tandis que d'autres se regroupent de façon directionnelle et active grâce à des protéines du cytosquelette ou du nucléo-squelette. Des expériences de Hi-C dans les cellules DivA déplétées ou non en acteurs de la mobilité active (SUN2, ARP2) ou en acteurs de la séparation de phase (53BP1, FUS, HP1, RIF1 ?) devraient être réalisées afin de comprendre s'il existe plusieurs classes de DSB nécessitant des mécanismes différents pour se regrouper.

C. Le regroupement des DSB peut conduire à la formation de translocations

Il est possible d'imaginer que le regroupement de TAD endommagés puisse être délétère pour les cellules. En effet, la juxtaposition de plusieurs DSB et donc de plusieurs extrémités d'ADN peut conduire à une religation illégitime entre les extrémités d'ADN des différentes DSB (Roukos et al., 2013). De plus, nous avons montré que, tout comme le regroupement des DSB,

DISCUSSION

la fréquence de translocations est plus forte en G1 et dépend des acteurs du regroupement des DSB (SUN2, ARP2, 53BP1, séparation de phase). L'ensemble de ces résultats suggère que le regroupement des DSB en G1 pourrait provoquer l'apparition de translocations.

En accord avec cette hypothèse, beaucoup de DSB endogènes s'accumulent au niveau des frontières de TAD de façon dépendante de la Topoisomérase II, notamment lorsque des gènes sont présents à proximité de ces frontières (Canela et al., 2017, 2019). Par ailleurs, des DSB survenant sur des frontières de TAD induisent une forte propagation de γ H2AX puisqu'il se propage sur les deux TAD partageant la frontière (Collins et al., 2020). Nous avons montré que la quantité de TAD cliques est proportionnelle à la quantité de γ H2AX et de transcription autour des DSB. Il est donc possible d'imaginer que ces DSB induites aux frontières de TAD près de gènes actifs pourraient fortement se regrouper, ce qui pourrait entraîner l'apparition de translocations. Or, il a justement été démontré que ce type de DSB sont des « hotspots » de translocations, à l'origine de leucémies (Gothe et al., 2019).

Enfin, le regroupement des DSB concernant principalement les DSB réparées par HR c'est-à-dire les DSB survenant dans des gènes actifs, l'apparition de translocations dans des gènes actifs pourrait avoir des effets très délétères pour les organismes, tels que l'apparition de cancers. Or, de nombreuses stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses reposent sur l'induction de DSB. Ainsi, il est possible d'imaginer que ce phénomène de regroupement des DSB pourrait potentiellement être à l'origine de cancers secondaires, c'est-à-dire de cancers dus aux traitements eux-mêmes, comme c'est le cas pour certaines leucémies (Ezoe, 2012). Il est donc possible que la meilleure compréhension de ce phénomène pourrait permettre de potentialiser les thérapies anti-cancéreuses en ciblant des acteurs du regroupement des DSB afin de limiter l'apparition de cancers secondaires.

D. Les potentiels bénéfiques du regroupement des DSB

Bien que le regroupement des DSB ait été impliqué dans la recherche d'homologie en G2 chez les mammifères (Schrank et al., 2018), le rôle du regroupement des DSB en G1 n'est que peu caractérisé.

Le regroupement des DSB étant majoritairement observé en G1, lorsque la réparation par HR est inhibée, il est peu probable que ce phénomène reflète de la recherche d'homologie. En accord avec cela, la formation de TAD cliques entre plus de deux TAD endommagés de

DISCUSSION

différents chromosomes non homologues, semble confirmer que le TAD cliques ne permet pas de rapprocher spécifiquement des séquences d'homologie.

Le regroupement des DSB dépend d'ATM et de la quantité de γ H2AX déposé aux DSB. ATM et γ H2AX n'étant pas indispensable à la réparation des DSB, ATM et potentiellement γ H2AX favorisent néanmoins la fidélité de la réparation (Bennardo and Stark, 2010; Bhargava et al., 2017; Caron et al., 2015). Une hypothèse serait donc que le regroupement des DSB permette, dans la majorité des cas, une réparation plus fine des DSB.

D1. Concentrer les facteurs de réparation ?

Comme cela a été proposé chez la levure, le regroupement de DSB pourrait favoriser la concentration des facteurs de réparation afin de potentialiser la réparation. En accord avec cette hypothèse, le regroupement des DSB dépend du niveau de γ H2AX. Or, il a été montré que H2AX favorise l'accumulation et la rétention des protéines de réparation (Celeste et al., 2003). Il serait donc possible que γ H2AX potentialise la quantité de facteurs de réparation aux DSB grâce à son rôle dans le regroupement des DSB. Néanmoins, cette hypothèse ne semble pas être la plus probable puisque un blocage des DSB en G1 retarde la réparation des DSB (Aymard et al., 2017), ce qui pourrait invalider l'hypothèse d'une réparation plus efficace en G1 grâce au regroupement des DSB.

D2. Mettre en pause la réparation ?

Le regroupement des DSB en G1 pourrait permettre de mettre en pause la réparation afin d'attendre un moment plus propice à leur réparation efficace. En effet, les DSB qui se regroupent en G1 sont les DSB induites dans les gènes, donc réparées préférentiellement par HR. Or, en G1, la HR est inhibée. Une hypothèse serait que tandis que les DSB induites dans les régions inactives pourraient être réparées tout au long du cycle cellulaire par NHEJ, des DSB induites dans des gènes en G1 se regrouperaient afin d'attendre d'être en phase S/G2 pour pouvoir être réparées par HR. Le regroupement des DSB pourrait par exemple contribuer à isoler les TAD endommagés du génome afin de limiter la signalisation des DSB et donc d'empêcher l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, malgré la persistance des DSB observée en G1, la progression du cycle cellulaire se poursuit correctement jusqu'à la phase G2 (Massip et al., 2010).

DISCUSSION

En accord avec cette hypothèse, un délai de réparation des DSB sujettes au regroupement est observé dans des cellules bloquées en G1 (Aymard et al., 2017), signifiant que ces DSB auraient besoin de passer en phase S pour être réparées. Néanmoins, dans cette hypothèse, la question se pose de comment une région d'ADN endommagée pourrait être répliquée correctement afin de générer une chromatide sœur, qui pourra ensuite être utilisée comme matrice de réparation par HR.

D3. Utiliser une voie de réparation alternative ?

De façon intéressante, un recrutement de Rad51 aux DSB a été observé en G1 chez la souris, notamment au niveau de DSB centromériques (Tsouroula et al., 2016). Une synthèse d'ADN a également été détectée en G1 au niveau de DSB induites dans le rDNA (van Sluis and McStay, 2015), suggérant que la HR, ou une voie de réparation alternative reposant sur un recrutement de Rad51 et sur une étape de synthèse d'ADN, pourrait être mise en place en G1 dans certaines conditions. Une hypothèse serait que le regroupement des TAD endommagés en G1 pourrait par exemple permettre de créer un compartiment particulier au sein du noyau dans lequel la mise en place d'une voie de réparation reposant sur Rad51 et sur la synthèse d'ADN est possible.

Néanmoins, 53BP1 ayant un rôle majeur dans l'inhibition de la résection ainsi que dans le regroupement des DSB (Chapman et al., 2013; Kilic et al., 2019), une autre possibilité serait que le regroupement des DSB conduise à une inhibition de la résection. En effet, afin d'inhiber la résection 53BP1 et son co-facteur RIF1 sont capables de recruter le complexe Pol α /primase afin de re-synthétiser des extrémités d'ADN résectées (Mirman et al., 2018). Une persistance des DSB intra-géniques, causée par une impossibilité d'être réparée par HR en G1, pourrait conduire à un regroupement des DSB dépendant de 53BP1 dans le but de finalement réparer ces DSB persistantes par NHEJ.

En conclusion, le rôle du regroupement des DSB en G1 est inconnu. Bien qu'il semble probable que ce phénomène contribue à la réparation fidèle des DSB, il semble également avoir des conséquences délétères, telles que des translocations. La connaissance des DSB qui sont sujettes à un regroupement étant à présent connue (Aymard et al., 2017, notre présente étude), des études supplémentaires dans les différentes phases du cycle cellulaire devraient permettre à l'avenir de comprendre le rôle exact du regroupement des TAD endommagés.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam, S., and Polo, S.E. (2014). Blurring the line between the DNA damage response and transcription: the importance of chromatin dynamics. *Exp. Cell Res.* *329*, 148–153.
- Adam, S., Dabin, J., Chevallier, O., Leroy, O., Baldeyron, C., Corpet, A., Lomonte, P., Renaud, O., Almouzni, G., and Polo, S.E. (2016). Real-Time Tracking of Parental Histones Reveals Their Contribution to Chromatin Integrity Following DNA Damage. *Mol Cell* *64*, 65–78.
- Agmon, N., Liefshitz, B., Zimmer, C., Fabre, E., and Kupiec, M. (2013). Effect of nuclear architecture on the efficiency of double-strand break repair. *Nature Cell Biology* *15*, 694–699.
- Altmeyer, M., Neelsen, K.J., Teloni, F., Pozdnyakova, I., Pellegrino, S., Grøfte, M., Rask, M.-B.D., Streicher, W., Jungmichel, S., Nielsen, M.L., et al. (2015). Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose). *Nature Communications* *6*, 1–12.
- An, J., Huang, Y.-C., Xu, Q.-Z., Zhou, L.-J., Shang, Z.-F., Huang, B., Wang, Y., Liu, X.-D., Wu, D.-C., and Zhou, P.-K. (2010). DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol. Biol.* *11*, 18.
- Arnould, C., and Legube, G. (2020). The Secret Life of Chromosome Loops upon DNA Double-Strand Break. *Journal of Molecular Biology* *432*, 724–736.
- Arnould, C., Rocher, V., and Legube, G. (2021). Analyzing Homologous Recombination at a Genome-Wide Level. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* *2153*, 427–438.
- Aten, J.A. (2004). Dynamics of DNA Double-Strand Breaks Revealed by Clustering of Damaged Chromosome Domains. *Science* *303*, 92–95.
- Atsumi, Y., Minakawa, Y., Ono, M., Dobashi, S., Shinohe, K., Shinohara, A., Takeda, S., Takagi, M., Takamatsu, N., Nakagama, H., et al. (2015). ATM and SIRT6/SNF2H Mediate Transient H2AX Stabilization When DSBs Form by Blocking HUWE1 to Allow Efficient γ H2AX Foci Formation. *Cell Reports* *13*, 2728–2740.
- Awwad, S.W., Abu-Zhayia, E.R., Guttmann-Raviv, N., and Ayoub, N. (2017). NELF-E is recruited to DNA double-strand break sites to promote transcriptional repression and repair. *EMBO Reports* *18*, 745–764.
- Aymard, F., and Legube, G. (2016). A TAD closer to ATM. *Molecular & Cellular Oncology* *3*, e1134411.
- Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C.K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., Iacovoni, J.S., Daburon, V., Miller, K.M., Jackson, S.P., et al. (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* *21*, 366–374.
- Aymard, F., Aguirrebengoa, M., Guillou, E., Javierre, B.M., Bugler, B., Arnould, C., Rocher, V., Iacovoni, J.S., Biernacka, A., Skrzypczak, M., et al. (2017). Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes. *Nature Structural & Molecular Biology* *24*, 353–361.
- Ayrapetov, M.K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y., and Price, B.D. (2014). DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 9169–9174.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* *21*, 381–395.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barajas-Mora, E.M., Kleiman, E., Xu, J., Carrico, N.C., Lu, H., Oltz, E.M., Murre, C., and Feeney, A.J. (2019). A B-Cell-Specific Enhancer Orchestrates Nuclear Architecture to Generate a Diverse Antigen Receptor Repertoire. *Molecular Cell* 73, 48-60.e5.
- Bassing, C.H., Chua, K.F., Sekiguchi, J., Suh, H., Whitlow, S.R., Fleming, J.C., Monroe, B.C., Ciccone, D.N., Yan, C., Vlasakova, K., et al. (2002). Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8173–8178.
- Batté, A., Brocas, C., Bordelet, H., Hocher, A., Ruault, M., Adjiri, A., Taddei, A., and Dubrana, K. (2017). Recombination at subtelomeres is regulated by physical distance, double-strand break resection and chromatin status. *The EMBO Journal* 36, 2609–2625.
- Bauerschmidt, C., Woodcock, M., Stevens, D.L., Hill, M.A., Rothkamm, K., and Helleday, T. (2011). Cohesin phosphorylation and mobility of SMC1 at ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells. *Experimental Cell Research* 317, 330–337.
- Beagrie, R.A., Scialdone, A., Schueler, M., Kraemer, D.C.A., Chotalia, M., Xie, S.Q., Barbieri, M., de Santiago, I., Lavitas, L.-M., Branco, M.R., et al. (2017). Complex multi-enhancer contacts captured by genome architecture mapping. *Nature* 543, 519–524.
- Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2010). Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair* 9, 1219–1228.
- Belin, B.J., Lee, T., and Mullins, R.D. (2015). DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin -2 and Spire- $\frac{1}{2}$ that promotes efficient DNA repair. [corrected]. *ELife* 4, e07735.
- Beliveau, B.J., Boettiger, A.N., Nir, G., Bintu, B., Yin, P., Zhuang, X., and Wu, C.-T. (2017). In Situ Super-Resolution Imaging of Genomic DNA with OligoSTORM and OligoDNA-PAINT. *Methods Mol. Biol.* 1663, 231–252.
- Bennardo, N., and Stark, J.M. (2010). ATM Limits Incorrect End Utilization during Non-Homologous End Joining of Multiple Chromosome Breaks. *PLOS Genetics* 6, e1001194.
- Berg, J. van den, Joosten, S.E.P., Kim, Y., Manjón, A.G., Krenning, L., Koob, L., Feringa, F.M., Klompmaker, R., Broek, B. van den, Jalink, K., et al. (2019). DNA end-resection in highly accessible chromatin produces a toxic break. *BioRxiv* 691857.
- Bersaglieri, C., and Santoro, R. (2019). Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells* 8, 579.
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A.A., Krempler, A., Jeggo, P.A., and Löbrich, M. (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO Journal* 28, 3413–3427.
- Bhargava, R., Carson, C.R., Lee, G., and Stark, J.M. (2017). Contribution of canonical nonhomologous end joining to chromosomal rearrangements is enhanced by ATM kinase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 728–733.
- Bierne, H., Tham, T.N., Batsche, E., Dumay, A., Leguillou, M., Kernéis-Golsteyn, S., Regnault, B., Seeler, J.S., Muchardt, C., Feunteun, J., et al. (2009). Human BAHD1 promotes heterochromatic gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13826–13831.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell* *66*, 801–817.
- Boddy, M.N., Gaillard, P.-H.L., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates, J.R., and Russell, P. (2001). Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* *107*, 537–548.
- Boehning, M., Dugast-Darzacq, C., Rankovic, M., Hansen, A.S., Yu, T., Marie-Nelly, H., McSwiggen, D.T., Kobic, G., Dailey, G.M., Cramer, P., et al. (2018). RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation. *Nature Structural & Molecular Biology* *25*, 833–840.
- Bonev, B., Mendelson Cohen, N., Szabo, Q., Fritsch, L., Papadopoulos, G.L., Lubling, Y., Xu, X., Lv, X., Hugnot, J.-P., Tanay, A., et al. (2017). Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development. *Cell* *171*, 557-572.e24.
- Bot, C., Pfeiffer, A., Giordano, F., Manjeera, D.E., Dantuma, N.P., and Ström, L. (2017). Independent mechanisms recruit the cohesin loader protein NIPBL to sites of DNA damage. *J Cell Sci* *130*, 1134–1146.
- Boyle, S. (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Human Molecular Genetics* *10*, 211–219.
- Bracken, A.P., Brien, G.L., and Verrijzer, C.P. (2019). Dangerous liaisons: interplay between SWI/SNF, NuRD, and Polycomb in chromatin regulation and cancer. *Genes Dev.* *33*, 936–959.
- Bryans, M., Valenzano, M.C., and Stamato, T.D. (1999). Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: evidence for stabilization by XRCC4. *Mutat. Res.* *433*, 53–58.
- Burgess, R.C., Burman, B., Kruhlak, M.J., and Misteli, T. (2014). Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. *Cell Rep* *9*, 1703–1717.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* *276*, 42462–42467.
- Burma, S., Chen, B.P.C., and Chen, D.J. (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair* *5*, 1042–1048.
- Busslinger, G.A., Stocsits, R.R., van der Lelij, P., Axelsson, E., Tedeschi, A., Galjart, N., and Peters, J.-M. (2017). Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature* *544*, 503–507.
- Canela, A., Maman, Y., Jung, S., Wong, N., Callen, E., Day, A., Kieffer-Kwon, K.-R., Pekowska, A., Zhang, H., Rao, S.S.P., et al. (2017). Genome Organization Drives Chromosome Fragility. *Cell* *170*, 507-521.e18.
- Canela, A., Maman, Y., Huang, S.-Y.N., Wutz, G., Tang, W., Zagnoli-Vieira, G., Callen, E., Wong, N., Day, A., Peters, J.-M., et al. (2019). Topoisomerase II-Induced Chromosome Breakage and Translocation Is Determined by Chromosome Architecture and Transcriptional Activity. *Mol. Cell* *75*, 252-266.e8.
- Caridi, C.P., D’Agostino, C., Ryu, T., Zapotoczny, G., Delabaere, L., Li, X., Khodaverdian, V.Y., Amaral, N., Lin, E., Rau, A.R., et al. (2018). Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature* *559*, 54–60.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Caron, P., and Polo, S.E. (2020). Reshaping Chromatin Architecture around DNA Breaks. *Trends Biochem. Sci.* *45*, 177–179.
- Caron, M.-C., Sharma, A.K., O'Sullivan, J., Myler, L.R., Ferreira, M.T., Rodrigue, A., Coulombe, Y., Ethier, C., Gagné, J.-P., Langelier, M.-F., et al. (2019a). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. *Nature Communications* *10*, 1–16.
- Caron, P., Aymard, F., Iacovoni, J.S., Briois, S., Canitrot, Y., Bugler, B., Massip, L., Losada, A., and Legube, G. (2012). Cohesin Protects Genes against γ H2AX Induced by DNA Double-Strand Breaks. *PLOS Genetics* *8*, e1002460.
- Caron, P., Choudjaye, J., Clouaire, T., Bugler, B., Daburon, V., Aguirrebengoa, M., Mangeat, T., Iacovoni, J.S., Álvarez-Quilón, A., Cortés-Ledesma, F., et al. (2015). Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Cell Reports* *13*, 1598–1609.
- Caron, P., Pankotai, T., Wiegant, W.W., Tollenaere, M.A.X., Furst, A., Bonhomme, C., Helfricht, A., de Groot, A., Pastink, A., Vertegaal, A.C.O., et al. (2019b). WWP2 ubiquitylates RNA polymerase II for DNA-PK-dependent transcription arrest and repair at DNA breaks. *Genes & Development* *33*, 684–704.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., et al. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* *296*, 922–927.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature Cell Biology* *5*, 675–679.
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., and Lieber, M.R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* *18*, 495–506.
- Chang, L.-H., Ghosh, S., and Noordermeer, D. (2020). TADs and Their Borders: Free Movement or Building a Wall? *Journal of Molecular Biology* *432*, 643–652.
- Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.-B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A.A., Adams, I.R., Batista, F.D., and Boulton, S.J. (2013). RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Mol Cell* *49*, 858–871.
- Chiolo, I., Minoda, A., Colmenares, S.U., Polyzos, A., Costes, S.V., and Karpen, G.H. (2011). Double-Strand Breaks in Heterochromatin Move Outside of a Dynamic HP1a Domain to Complete Recombinational Repair. *Cell* *144*, 732–744.
- Cho, N.W., Dilley, R.L., Lampson, M.A., and Greenberg, R.A. (2014). Interchromosomal Homology Searches Drive Directional ALT Telomere Movement and Synapsis. *Cell* *159*, 108–121.
- Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiácovo, M.P., and Elledge, S.J. (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *PNAS* *107*, 18475–18480.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 616–627.
- Clouaire, T., and Legube, G. (2015). DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision? *Nucleus* 6, 107–113.
- Clouaire, T., and Legube, G. (2019). A Snapshot on the Cis Chromatin Response to DNA Double-Strand Breaks. *Trends in Genetics* 35, 330–345.
- Clouaire, T., Rocher, V., Lashgari, A., Arnould, C., Aguirrebengoa, M., Biernacka, A., Skrzypczak, M., Aymard, F., Fongang, B., Dojer, N., et al. (2018). Comprehensive Mapping of Histone Modifications at DNA Double-Strand Breaks Deciphers Repair Pathway Chromatin Signatures. *Molecular Cell* 72, 250-262.e6.
- Cohen, S., Puget, N., Lin, Y.-L., Clouaire, T., Aguirrebengoa, M., Rocher, V., Pasero, P., Canitrot, Y., and Legube, G. (2018). Senataxin resolves RNA:DNA hybrids forming at DNA double-strand breaks to prevent translocations. *Nature Communications* 9.
- Collins, P.L., Purman, C., Porter, S.I., Nganga, V., Saini, A., Hayer, K.E., Gurewitz, G.L., Sleckman, B.P., Bednarski, J.J., Bassing, C.H., et al. (2020). DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner. *Nat Commun* 11, 3158.
- Colmenares, S.U., Swenson, J.M., Langley, S.A., Kennedy, C., Costes, S.V., and Karpen, G.H. (2017). Drosophila histone demethylase KDM4A has enzymatic and non-enzymatic roles in controlling heterochromatin integrity. *Dev Cell* 42, 156-169.e5.
- Covo, S., Westmoreland, J.W., Gordenin, D.A., and Resnick, M.A. (2010). Cohesin Is Limiting for the Suppression of DNA Damage–Induced Recombination between Homologous Chromosomes. *PLOS Genetics* 6, e1001006.
- Cuella-Martin, R., Oliveira, C., Lockstone, H.E., Snellenberg, S., Grolmusova, N., and Chapman, J.R. (2016). 53BP1 Integrates DNA Repair and p53-Dependent Cell Fate Decisions via Distinct Mechanisms. *Mol. Cell* 64, 51–64.
- Davidson, I.F., Bauer, B., Goetz, D., Tang, W., Wutz, G., and Peters, J.-M. (2019). DNA loop extrusion by human cohesin. *Science* 366, 1338–1345.
- Deckbar, D., Jeggo, P.A., and Löbrich, M. (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 46, 271–283.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 21, 3192–3200.
- Dekker, J. (2002). Capturing Chromosome Conformation. *Science* 295, 1306–1311.
- Dev, H., Chiang, T.-W.W., Lescale, C., de Krijger, I., Martin, A.G., Pilger, D., Coates, J., Sczaniecka-Clift, M., Wei, W., Ostermaier, M., et al. (2018). Shieldin complex promotes DNA end-joining and counters homologous recombination in BRCA1-null cells. *Nat. Cell Biol.* 20, 954–965.
- Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B.D., and Gasser, S.M. (2012). Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nat. Cell Biol.* 14, 502–509.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* *485*, 376–380.
- Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., et al. (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* *136*, 435–446.
- Dryden, N.H., Broome, L.R., Dudbridge, F., Johnson, N., Orr, N., Schoenfelder, S., Nagano, T., Andrews, S., Wingett, S., Kozarewa, I., et al. (2014). Unbiased analysis of potential targets of breast cancer susceptibility loci by Capture Hi-C. *Genome Res.* *24*, 1854–1868.
- Erdel, F., Rademacher, A., Vlijm, R., Tünnermann, J., Frank, L., Weinmann, R., Schweigert, E., Yserentant, K., Hummert, J., Bauer, C., et al. (2020). Mouse Heterochromatin Adopts Digital Compaction States without Showing Hallmarks of HP1-Driven Liquid-Liquid Phase Separation. *Molecular Cell* *78*, 236-249.e7.
- Evdokimova, V.N., Gandhi, M., Nikitski, A.V., Bakkenist, C.J., and Nikiforov, Y.E. (2018). Nuclear myosin/actin-motored contact between homologous chromosomes is initiated by ATM kinase and homology-directed repair proteins at double-strand DNA breaks to suppress chromosome rearrangements. *Oncotarget* *9*, 13612–13622.
- Ezoe, S. (2012). Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *International Journal of Environmental Research and Public Health* *9*, 2444–2453.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T.S., Mitrea, D.M., Zhu, L., Richardson, T.M., Kriwacki, R.W., Pappu, R.V., and Brangwynne, C.P. (2016). Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell* *165*, 1686–1697.
- Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.-T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P.J., Morales, J.C., Naka, K., Xia, Z., Camerini-Otero, R.D., Motoyama, N., et al. (2002). DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat. Cell Biol.* *4*, 993–997.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* *3*, 959–967.
- Fortuny, A., and Polo, S.E. (2018). The response to DNA damage in heterochromatin domains. *Chromosoma* *127*, 291–300.
- Foti, R., Gnan, S., Cornacchia, D., Dileep, V., Bulut-Karslioglu, A., Diehl, S., Bunes, A., Klein, F.A., Huber, W., Johnstone, E., et al. (2016). Nuclear Architecture Organized by Rif1 Underpins the Replication-Timing Program. *Molecular Cell* *61*, 260–273.
- Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C.Y., Huang, H., Landry, M.-C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., et al. (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* *499*, 50–54.
- Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., and Mirny, L.A. (2016). Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. *Cell Reports* *15*, 2038–2049.
- Fyodorov, D.V., Zhou, B.-R., Skoultchi, A.I., and Bai, Y. (2018). Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *19*, 192–206.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gandhi, M., Evdokimova, V.N., T.Cuenco, K., Nikiforova, M.N., Kelly, L.M., Stringer, J.R., Bakkenist, C.J., and Nikiforov, Y.E. (2012). Homologous chromosomes make contact at the sites of double-strand breaks in genes in somatic G0/G1-phase human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 9454–9459.
- Ganji, M., Shaltiel, I.A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C.H., and Dekker, C. (2018). Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* *360*, 102–105.
- García-Muse, T., and Aguilera, A. (2016). Transcription–replication conflicts: how they occur and how they are resolved. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *17*, 553–563.
- Gelot, C., Guirouilh-Barbat, J., Guen, T.L., Dardillac, E., Chailleux, C., Canitrot, Y., and Lopez, B.S. (2016). The Cohesin Complex Prevents the End Joining of Distant DNA Double-Strand Ends. *Molecular Cell* *61*, 15–26.
- Georgoulis, A., Vorgias, C.E., Chrousos, G.P., and Rogakou, E.P. (2017). Genome Instability and γ H2AX. *Int J Mol Sci* *18*.
- Ghavi-Helm, Y., Jankowski, A., Meiers, S., Viales, R.R., Korb, J.O., and Furlong, E.E.M. (2019). Highly rearranged chromosomes reveal uncoupling between genome topology and gene expression. *Nature Genetics* *51*, 1272–1282.
- Gheldof, N., Leleu, M., Noordermeer, D., Rougemont, J., and Reymond, A. (2012). Detecting Long-Range Chromatin Interactions Using the Chromosome Conformation Capture Sequencing (4C-seq) Method. In *Gene Regulatory Networks: Methods and Protocols*, B. Deplancke, and N. Gheldof, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 211–225.
- Ghezraoui, H., Piganeau, M., Renouf, B., Renaud, J.-B., Sallmyr, A., Ruis, B., Oh, S., Tomkinson, A.E., Hendrickson, E.A., Giovannangeli, C., et al. (2014). Chromosomal Translocations in Human Cells Are Generated by Canonical Nonhomologous End-Joining. *Molecular Cell* *55*, 829–842.
- Ghezraoui, H., Oliveira, C., Becker, J.R., Bilham, K., Moralli, D., Anzilotti, C., Fischer, R., Deobagkar-Lele, M., Sanchiz-Calvo, M., Fueyo-Marcos, E., et al. (2018). 53BP1 cooperation with the REV7-shieldin complex underpins DNA structure-specific NHEJ. *Nature* *560*, 122–127.
- Gong, F., Chiu, L.-Y., Cox, B., Aymard, F., Clouaire, T., Leung, J.W., Cammarata, M., Perez, M., Agarwal, P., Brodbelt, J.S., et al. (2015). Screen identifies bromodomain protein ZMYND8 in chromatin recognition of transcription-associated DNA damage that promotes homologous recombination. *Genes Dev.* *29*, 197–211.
- Gong, F., Clouaire, T., Aguirrebengoa, M., Legube, G., and Miller, K.M. (2017). Histone demethylase KDM5A regulates the ZMYND8–NuRD chromatin remodeler to promote DNA repair. *J Cell Biol* *216*, 1959–1974.
- Gothe, H.J., Bouwman, B.A.M., Gusmao, E.G., Piccinno, R., Petrosino, G., Sayols, S., Drechsel, O., Minneker, V., Josipovic, N., Mizi, A., et al. (2019). Spatial Chromosome Folding and Active Transcription Drive DNA Fragility and Formation of Oncogenic MLL Translocations. *Molecular Cell* *75*, 267–283.e12.
- Guénolé, A., and Legube, G. (2017). A meeting at risk: Unrepaired DSBs go for broke. *Nucleus* *8*, 589–599.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Guillou, E., Ibarra, A., Coulon, V., Casado-Vela, J., Rico, D., Casal, I., Schwob, E., Losada, A., and Méndez, J. (2010). Cohesin organizes chromatin loops at DNA replication factories. *Genes Dev* 24, 2812–2822.
- Guo, C., Yoon, H.S., Franklin, A., Jain, S., Ebert, A., Cheng, H.-L., Hansen, E., Despo, O., Bossen, C., Vettermann, C., et al. (2011). CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* 477, 424–430.
- Gupta, R., Somyajit, K., Narita, T., Maskey, E., Stanlie, A., Kremer, M., Typas, D., Lammers, M., Mailand, N., Nussenzweig, A., et al. (2018). DNA Repair Network Analysis Reveals Shieldin as a Key Regulator of NHEJ and PARP Inhibitor Sensitivity. *Cell* 173, 972-988.e23.
- Haarhuis, J.H.I., van der Weide, R.H., Blomen, V.A., Yáñez-Cuna, J.O., Amendola, M., van Ruiten, M.S., Krijger, P.H.L., Teunissen, H., Medema, R.H., van Steensel, B., et al. (2017). The Cohesin Release Factor WAPL Restricts Chromatin Loop Extension. *Cell* 169, 693-707.e14.
- Han, D., Chen, Q., Shi, J., Zhang, F., and Yu, X. (2017). CTCF participates in DNA damage response via poly(ADP-ribosylation). *Scientific Reports* 7, 1–10.
- Harding, S.M., Boiarsky, J.A., and Greenberg, R.A. (2015). ATM Dependent Silencing Links Nucleolar Chromatin Reorganization to DNA Damage Recognition. *Cell Reports* 13, 251–259.
- Hauer, M.H., Seeber, A., Singh, V., Thierry, R., Sack, R., Amitai, A., Kryzhanovska, M., Eglinger, J., Holcman, D., Owen-Hughes, T., et al. (2017). Histone degradation in response to DNA damage enhances chromatin dynamics and recombination rates. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 99–107.
- Heitz, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb. Wiss. Botanik* 762–818.
- Hilmi, K., Jangal, M., Marques, M., Zhao, T., Saad, A., Zhang, C., Luo, V.M., Syme, A., Rejon, C., Yu, Z., et al. (2017). CTCF facilitates DNA double-strand break repair by enhancing homologous recombination repair. *Sci Adv* 3, e1601898.
- Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P., and Bradbury, E.M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 “tail” to DNA. *J. Biol. Chem.* 268, 305–314.
- Huen, M.S.Y., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M.B., and Chen, J. (2007). RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* 131, 901–914.
- Hustedt, N., and Durocher, D. (2017). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature Cell Biology* 19, 1–9.
- Hwang, S.Y., Kang, M.A., Baik, C.J., Lee, Y., Hang, N.T., Kim, B.-G., Han, J.S., Jeong, J.-H., Park, D., Myung, K., et al. (2019). CTCF cooperates with CtIP to drive homologous recombination repair of double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* 47, 9160–9179.
- Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of γ H2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *The EMBO Journal* 29, 1446–1457.
- Iannelli, F., Galbiati, A., Capozzo, I., Nguyen, Q., Magnuson, B., Michelini, F., D’Alessandro, G., Cabrini, M., Roncador, M., Francia, S., et al. (2017). A damaged genome’s transcriptional

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

landscape through multilayered expression profiling around in situ -mapped DNA double-strand breaks. *Nature Communications* **8**, 1–12.

Jain, S., Ba, Z., Zhang, Y., Dai, H.-Q., and Alt, F.W. (2018). CTCF-Binding Elements Mediate Accessibility of RAG Substrates During Chromatin Scanning. *Cell* **174**, 102-116.e14.

Jakob, B., Splinter, J., and Taucher-Scholz, G. (2009). Positional Stability of Damaged Chromatin Domains along Radiation Tracks in Mammalian Cells. *Radiat Res* **171**, 405–418.

Jakob, B., Splinter, J., Conrad, S., Voss, K.-O., Zink, D., Durante, M., Löbrich, M., and Taucher-Scholz, G. (2011). DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6489–6499.

Jimeno, S., Mejías-Navarro, F., Prados-Carvajal, R., and Huertas, P. (2019). Chapter Four - Controlling the balance between chromosome break repair pathways. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, R. Donev, ed. (Academic Press), pp. 95–134.

Kakarougkas, A., Ismail, A., Chambers, A.L., Riballo, E., Herbert, A.D., Künzel, J., Löbrich, M., Jeggo, P.A., and Downs, J.A. (2014). Requirement for PBAF in Transcriptional Repression and Repair at DNA Breaks in Actively Transcribed Regions of Chromatin. *Molecular Cell* **55**, 723–732.

Kelpsch, D.J., and Tootle, T.L. (2018). Nuclear Actin: From Discovery to Function. *Anat Rec (Hoboken)* **301**, 1999–2013.

Khurana, S., Kruhlak, M.J., Kim, J., Tran, A.D., Liu, J., Nyswaner, K., Shi, L., Jailwala, P., Sung, M.-H., Hakim, O., et al. (2014). A Macrohistone Variant Links Dynamic Chromatin Compaction to BRCA1-Dependent Genome Maintenance. *Cell Reports* **8**, 1049–1062.

Kilic, S., Lezaja, A., Gatti, M., Bianco, E., Michelena, J., Imhof, R., and Altmeyer, M. (2019). Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments. *The EMBO Journal* **38**, e101379.

Kim, B.-J., Li, Y., Zhang, J., Xi, Y., Li, Y., Yang, T., Jung, S.Y., Pan, X., Chen, R., Li, W., et al. (2010). Genome-wide Reinforcement of Cohesin Binding at Pre-existing Cohesin Sites in Response to Ionizing Radiation in Human Cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 22784–22792.

Kim, J., Sturgill, D., Tran, A.D., Sinclair, D.A., and Oberdoerffer, P. (2016). Controlled DNA double-strand break induction in mice reveals post-damage transcriptome stability. *Nucleic Acids Res.* **44**, e64.

Kim, J.-S., Krasieva, T.B., LaMorte, V., Taylor, A.M.R., and Yokomori, K. (2002a). Specific recruitment of human cohesin to laser-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* **277**, 45149–45153.

Kim, S.-T., Xu, B., and Kastan, M.B. (2002b). Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev.* **16**, 560–570.

Kim, Y., Shi, Z., Zhang, H., Finkelstein, I.J., and Yu, H. (2019). Human cohesin compacts DNA by loop extrusion. **6**.

Kind, J., Pagie, L., de Vries, S.S., Nahidiazar, L., Dey, S.S., Bienko, M., Zhan, Y., Lajoie, B., de Graaf, C.A., Amendola, M., et al. (2015). Genome-wide Maps of Nuclear Lamina Interactions in Single Human Cells. *Cell* **163**, 134–147.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kong, X., Ball, A.R., Pham, H.X., Zeng, W., Chen, H.-Y., Schmiesing, J.A., Kim, J.-S., Berns, M., and Yokomori, K. (2014). Distinct Functions of Human Cohesin-SA1 and Cohesin-SA2 in Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology* *34*, 685–698.
- Krawczyk, P.M., Stap, J., van Oven, C., Hoebe, R., and Aten, J.A. (2006). Clustering of double strand break-containing chromosome domains is not inhibited by inactivation of major repair proteins. *Radiat Prot Dosimetry* *122*, 150–153.
- Krawczyk, P.M., Borovski, T., Stap, J., Cijssouw, T., ten Cate, R., Medema, J.P., Kanaar, R., Franken, N. a. P., and Aten, J.A. (2012). Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell. Sci.* *125*, 2127–2133.
- Kruhlak, M., Crouch, E.E., Orlov, M., Montañó, C., Gorski, S.A., Nussenzweig, A., Misteli, T., Phair, R.D., and Casellas, R. (2007). The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks. *Nature* *447*, 730–734.
- Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., and Nussenzweig, A. (2006a). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* *172*, 823–834.
- Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., and Nussenzweig, A. (2006b). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* *172*, 823–834.
- Lang, F., Li, X., Zheng, W., Li, Z., Lu, D., Chen, G., Gong, D., Yang, L., Fu, J., Shi, P., et al. (2017). CTCF prevents genomic instability by promoting homologous recombination-directed DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, 10912–10917.
- Langdon, E.M., and Gladfelter, A.S. (2018). A New Lens for RNA Localization: Liquid-Liquid Phase Separation. *Annu. Rev. Microbiol.* *72*, 255–271.
- Larson, A.G., Elnatan, D., Keenen, M.M., Trnka, M.J., Johnston, J.B., Burlingame, A.L., Agard, D.A., Redding, S., and Narlikar, G.J. (2017). Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* *547*, 236–240.
- Lavin, M.F., Kozlov, S., Gatei, M., and Kijas, A.W. (2015). ATM-Dependent Phosphorylation of All Three Members of the MRN Complex: From Sensor to Adaptor. *Biomolecules* *5*, 2877–2902.
- Lawrimore, J., Barry, T.M., Barry, R.M., York, A.C., Friedman, B., Cook, D.M., Akialis, K., Tyler, J., Vasquez, P., Yeh, E., et al. (2017). Microtubule dynamics drive enhanced chromatin motion and mobilize telomeres in response to DNA damage. *Mol. Biol. Cell* *28*, 1701–1711.
- Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2005). ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science* *308*, 551–554.
- Lee, C.-S., Lee, K., Legube, G., and Haber, J.E. (2014). Dynamics of yeast histone H2A and H2B phosphorylation in response to a double-strand break. *Nat Struct Mol Biol* *21*, 103–109.
- Lee, C.-S., Wang, R.W., Chang, H.-H., Capurso, D., Segal, M.R., and Haber, J.E. (2016). Chromosome position determines the success of double-strand break repair. *PNAS* *113*, E146–E154.
- Lee, Y.-H., Kuo, C.-Y., Stark, J.M., Shih, H.-M., and Ann, D.K. (2013). HP1 promotes tumor suppressor BRCA1 functions during the DNA damage response. *Nucleic Acids Res* *41*, 5784–5798.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lengronne, A., Katou, Y., Mori, S., Yokobayashi, S., Kelly, G.P., Itoh, T., Watanabe, Y., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2004). Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* *430*, 573–578.

Li, K., Bronk, G., Kondev, J., and Haber, J.E. (2019). Yeast ATM and ATR use different mechanisms to spread histone H2A phosphorylation around a DNA double-strand break (Molecular Biology).

Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragooczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* *326*, 289–293.

Lisby, M., Mortensen, U.H., and Rothstein, R. (2003). Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat. Cell Biol.* *5*, 572–577.

Litwin, I., Pilarczyk, E., and Wysocki, R. (2018). The Emerging Role of Cohesin in the DNA Damage Response. *Genes (Basel)* *9*.

Lottersberger, F., Karssemeijer, R.A., Dimitrova, N., and de Lange, T. (2015). 53BP1 and the LINC Complex Promote Microtubule-Dependent DSB Mobility and DNA Repair. *Cell* *163*, 880–893.

Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., et al. (2006). MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals. *Molecular Cell* *21*, 187–200.

Luger, K. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *389*, 10.

Luijsterburg, M.S., Dinant, C., Lans, H., Stap, J., Wiernasz, E., Lagerwerf, S., Warmerdam, D.O., Lindh, M., Brink, M.C., Dobrucki, J.W., et al. (2009). Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J. Cell Biol.* *185*, 577–586.

Luijsterburg, M.S., de Krijger, I., Wiegant, W.W., Shah, R.G., Smeenk, G., de Groot, A.J.L., Pines, A., Vertegaal, A.C.O., Jacobs, J.J.L., Shah, G.M., et al. (2016). PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. *Molecular Cell* *61*, 547–562.

Lupiáñez, D.G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J.M., Laxova, R., et al. (2015). Disruptions of Topological Chromatin Domains Cause Pathogenic Rewiring of Gene-Enhancer Interactions. *Cell* *161*, 1012–1025.

Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2007). RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell* *131*, 887–900.

Mallette, F.A., Mattioli, F., Cui, G., Young, L.C., Hendzel, M.J., Mer, G., Sixma, T.K., and Richard, S. (2012). RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites: RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A. *The EMBO Journal* *31*, 1865–1878.

Marchal, C., Sima, J., and Gilbert, D.M. (2019). Control of DNA replication timing in the 3D genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 721–737.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Marnef, A., and Legube, G. (2017). Organizing DNA repair in the nucleus: DSBs hit the road. *Current Opinion in Cell Biology* *46*, 1–8.
- Marnef, A., Cohen, S., and Legube, G. (2017). Transcription-Coupled DNA Double-Strand Break Repair: Active Genes Need Special Care. *Journal of Molecular Biology* *429*, 1277–1288.
- Marnef, A., Finoux, A.-L., Arnould, C., Guillou, E., Daburon, V., Rocher, V., Mangeat, T., Mangeot, P.E., Ricci, E.P., and Legube, G. (2019). A cohesin/HUSH- and LINC-dependent pathway controls ribosomal DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* *33*, 1175–1190.
- Martire, S., and Banaszynski, L.A. (2020). The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *21*, 522–541.
- Massip, L., Caron, P., Iacovoni, J.S., Trouche, D., and Legube, G. (2010). Deciphering the chromatin landscape induced around DNA double strand breaks. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* *9*, 2963–2972.
- Matelot, M., and Noordermeer, D. (2016). Determination of High-Resolution 3D Chromatin Organization Using Circular Chromosome Conformation Capture (4C-seq). *Methods Mol. Biol.* *1480*, 223–241.
- Mattiroli, F., Vissers, J.H.A., van Dijk, W.J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., Marteiijn, J.A., and Sixma, T.K. (2012). RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell* *150*, 1182–1195.
- Meaburn, K.J., Misteli, T., and Soutoglou, E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Seminars in Cancer Biology* *17*, 80–90.
- Meisenberg, C., Pinder, S.I., Hopkins, S.R., Wooller, S.K., Benstead-Hume, G., Pearl, F.M.G., Jeggo, P.A., and Downs, J.A. (2019). Repression of Transcription at DNA Breaks Requires Cohesin throughout Interphase and Prevents Genome Instability. *Molecular Cell* *73*, 212-223.e7.
- Miné-Hattab, J., and Rothstein, R. (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nat. Cell Biol.* *14*, 510–517.
- Mirman, Z., Lottersberger, F., Takai, H., Kibe, T., Gong, Y., Takai, K., Bianchi, A., Zimmermann, M., Durocher, D., and de Lange, T. (2018). 53BP1-RIF1-shieldin counteracts DSB resection through CST- and Pol α -dependent fill-in. *Nature* *560*, 112–116.
- Mooser, C., Symeonidou, I.-E., Leimbacher, P.-A., Ribeiro, A., Shorrocks, A.-M.K., Jungmichel, S., Larsen, S.C., Knechtle, K., Jasrotia, A., Zurbriggen, D., et al. (2020). Treacle controls the nucleolar response to rDNA breaks via TOPBP1 recruitment and ATR activation. *Nature Communications* *11*, 123.
- Moronta-Gines, M., van Staveren, T.R.H., and Wendt, K.S. (2019). One ring to bind them – Cohesin’s interaction with chromatin fibers. *Essays Biochem* *63*, 167–176.
- Musselman, C.A., Lalonde, M.-E., Côté, J., and Kutateladze, T.G. (2012). Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 1218–1227.
- Nagai, S., Dubrana, K., Tsai-Pflugfelder, M., Davidson, M.B., Roberts, T.M., Brown, G.W., Varela, E., Hediger, F., Gasser, S.M., and Krogan, N.J. (2008). Functional Targeting of DNA Damage to a Nuclear Pore-Associated SUMO-Dependent Ubiquitin Ligase. *Science* *322*, 597–602.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Nagano, T., Lubling, Y., Stevens, T.J., Schoenfelder, S., Yaffe, E., Dean, W., Laue, E.D., Tanay, A., and Fraser, P. (2013). Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature* *502*, 59–64.
- Nagano, T., Lubling, Y., Várnai, C., Dudley, C., Leung, W., Baran, Y., Mendelson Cohen, N., Wingett, S., Fraser, P., and Tanay, A. (2017). Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution. *Nature* *547*, 61–67.
- Nakamura, K., Saredi, G., Becker, J.R., Foster, B.M., Nguyen, N.V., Beyer, T.E., Cesa, L.C., Faull, P.A., Lukauskas, S., Frimurer, T., et al. (2019). H4K20me0 recognition by BRCA1-BARD1 directs homologous recombination to sister chromatids. *Nat. Cell Biol.* *21*, 311–318.
- Narendra, V., Rocha, P.P., An, D., Raviram, R., Skok, J.A., Mazzone, E.O., and Reinberg, D. (2015). CTCF establishes discrete functional chromatin domains at the Hox clusters during differentiation. *Science* *347*, 1017–1021.
- Natale, F., Rapp, A., Yu, W., Maiser, A., Harz, H., Scholl, A., Grulich, S., Anton, T., Hörl, D., Chen, W., et al. (2017). Identification of the elementary structural units of the DNA damage response. *Nat Commun* *8*, 15760.
- Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* *25*, 350–362.
- Noordermeer, D., Leleu, M., Splinter, E., Rougemont, J., Laat, W.D., and Duboule, D. (2011). The Dynamic Architecture of Hox Gene Clusters. *Science* *334*, 222–225.
- Noordermeer, S.M., Adam, S., Setiawati, D., Barazas, M., Pettitt, S.J., Ling, A.K., Olivieri, M., Álvarez-Quilón, A., Moatti, N., Zimmermann, M., et al. (2018). The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature* *560*, 117–121.
- Nora, E.P., Lajoie, B.R., Schulz, E.G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., van Berkum, N.L., Meisig, J., Sedat, J., et al. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* *485*, 381–385.
- Nora, E.P., Goloborodko, A., Valton, A.-L., Gibcus, J.H., Uebersohn, A., Abdennur, N., Dekker, J., Mirny, L.A., and Bruneau, B.G. (2017). Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell* *169*, 930–944.e22.
- Nuebler, J., Fudenberg, G., Imakaev, M., Abdennur, N., and Mirny, L.A. (2018). Chromatin organization by an interplay of loop extrusion and compartmental segregation. *PNAS* *115*, E6697–E6706.
- Ochs, F., Karemire, G., Miron, E., Brown, J., Sedlackova, H., Rask, M.-B., Lampe, M., Buckle, V., Schermelleh, L., Lukas, J., et al. (2019). Stabilization of chromatin topology safeguards genome integrity. *Nature* *574*, 571–574.
- Oka, Y., Suzuki, K., Yamauchi, M., Mitsutake, N., and Yamashita, S. (2011). Recruitment of the cohesin loading factor NIPBL to DNA double-strand breaks depends on MDC1, RNF168 and HP1 γ in human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *411*, 762–767.
- Oshidari, R., Huang, R., Medghalchi, M., Tse, E.Y.W., Ashgriz, N., Lee, H.O., Wyatt, H., and Mekhail, K. (2020). DNA repair by Rad52 liquid droplets. *Nature Communications* *11*, 1–8.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ou, H.D., Phan, S., Deerinck, T.J., Thor, A., Ellisman, M.H., and O'Shea, C.C. (2017). ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* 357.
- Oza, P., Jaspersen, S.L., Miele, A., Dekker, J., and Peterson, C.L. (2009). Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes Dev.* 23, 912–927.
- Panier, S., and Boulton, S.J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15, 7–18.
- Pankotai, T., Bonhomme, C., Chen, D., and Soutoglou, E. (2012). DNAPKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 276–282.
- Parada, L.A., McQueen, P.G., and Misteli, T. (2004). Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol* 5, 1–9.
- Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., et al. (2008). Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell* 132, 422–433.
- Patel, A., Lee, H.O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M.Y., Stoyanov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T.M., et al. (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* 162, 1066–1077.
- Paulsen, J., Liyakat Ali, T.M., Nekrasov, M., Delbarre, E., Baudement, M.-O., Kurscheid, S., Tremethick, D., and Collas, P. (2019). Long-range interactions between topologically associating domains shape the four-dimensional genome during differentiation. *Nat Genet* 51, 835–843.
- Pellegrino, S., Michelena, J., Teloni, F., Imhof, R., and Altmeyer, M. (2017). Replication-Coupled Dilution of H4K20me2 Guides 53BP1 to Pre-replicative Chromatin. *Cell Rep* 19, 1819–1831.
- Pfister, S.X., Ahrabi, S., Zalmas, L.-P., Sarkar, S., Aymard, F., Bachrati, C.Z., Helleday, T., Legube, G., La Thangue, N.B., Porter, A.C.G., et al. (2014). SETD2-Dependent Histone H3K36 Trimethylation Is Required for Homologous Recombination Repair and Genome Stability. *Cell Reports* 7, 2006–2018.
- Phillips, J.E., and Corces, V.G. (2009). CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell* 137, 1194–1211.
- Piché, J., Van Vliet, P.P., Pucéat, M., and Andelfinger, G. (2019). The expanding phenotypes of cohesinopathies: one ring to rule them all! *Cell Cycle* 18, 2828–2848.
- Pietenpol, J.A., and Stewart, Z.A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling:: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181–182, 475–481.
- Piquet, S., Parc, F.L., Bai, S.-K., Chevallier, O., Adam, S., and Polo, S.E. (2018). The Histone Chaperone FACT Coordinates H2A.X-Dependent Signaling and Repair of DNA Damage. *Molecular Cell* 72, 888-901.e7.
- Plys, A.J., Davis, C.P., Kim, J., Rizki, G., Keenen, M.M., Marr, S.K., and Kingston, R.E. (2019). Phase separation of Polycomb-repressive complex 1 is governed by a charged disordered region of CBX2. *Genes Dev* 33, 799–813.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Polo, S.E. (2017). Switching genes to silent mode near DNA double-strand breaks. *EMBO Reports* 18, 659–660.
- Polo, S.E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y., and Jackson, S.P. (2010). Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *EMBO J.* 29, 3130–3139.
- Pope, B.D., Ryba, T., Dileep, V., Yue, F., Wu, W., Denas, O., Vera, D.L., Wang, Y., Hansen, R.S., Canfield, T.K., et al. (2014). Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature* 515, 402–405.
- Potts, P.R., Porteus, M.H., and Yu, H. (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *EMBO J* 25, 3377–3388.
- Puget, N., Miller, K.M., and Legube, G. (2019). Non-canonical DNA/RNA structures during Transcription-Coupled Double-Strand Break Repair: Roadblocks or Bona fide repair intermediates? *DNA Repair (Amst.)* 81, 102661.
- Rao, S.S.P., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S., et al. (2014). A three-dimensional map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159, 1665–1680.
- Rao, S.S.P., Huang, S.-C., Glenn St Hilaire, B., Engreitz, J.M., Perez, E.M., Kieffer-Kwon, K.-R., Sanborn, A.L., Johnstone, S.E., Bascom, G.D., Bochkov, I.D., et al. (2017). Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains. *Cell* 171, 305-320.e24.
- Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T., and Chen, J. (2001). Tumor Suppressor P53 Binding Protein 1 (53bp1) Is Involved in DNA Damage–Signaling Pathways. *J Cell Biol* 153, 613–620.
- Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006). A double Holliday junction dissolvosome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *J. Biol. Chem.* 281, 13861–13864.
- Rocha, P.P., Raviram, R., Fu, Y., Kim, J., Luo, V.M., Aljoufi, A., Swanzey, E., Pasquarella, A., Balestrini, A., Miraldi, E.R., et al. (2016). A Damage-Independent Role for 53BP1 that Impacts Break Order and Igh Architecture during Class Switch Recombination. *Cell Reports* 16, 48–55.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- Roukos, V., Voss, T.C., Schmidt, C.K., Lee, S., Wangsa, D., and Misteli, T. (2013). Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science* 341, 660–664.
- Rubio, E.D., Reiss, D.J., Welcsh, P.L., Disteche, C.M., Filippova, G.N., Baliga, N.S., Aebersold, R., Ranish, J.A., and Krumm, A. (2008). CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 8309–8314.
- Ryu, T., Spatola, B., Delabaere, L., Bowlin, K., Hopp, H., Kunitake, R., Karpen, G.H., and Chiolo, I. (2015). Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair. *Nature Cell Biology* 17, 1401–1411.
- Sanborn, A.L., Rao, S.S.P., Huang, S.-C., Durand, N.C., Huntley, M.H., Jewett, A.I., Bochkov, I.D., Chinnappan, D., Cutkosky, A., Li, J., et al. (2015). Chromatin extrusion explains key

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* *112*, E6456–E6465.

Sanders, J.T., Freeman, T.F., Xu, Y., Golloshi, R., Stallard, M.A., Martin, R.S., Balajee, A.S., and McCord, R.P. (2019). Radiation-Induced DNA Damage and Repair Effects on 3D Genome Organization (Genomics).

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

Savic, V., Yin, B., Maas, N.L., Bredemeyer, A.L., Carpenter, A.C., Helmink, B.A., Yang-lott, K.S., Sleckman, B.P., and Bassing, C.H. (2009). Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Mol. Cell* *34*, 298–310.

Schrank, B.R., Aparicio, T., Li, Y., Chang, W., Chait, B.T., Gundersen, G.G., Gottesman, M.E., and Gautier, J. (2018). Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. *Nature* *559*, 61–66.

Schwarzer, W., Abdennur, N., Goloborodko, A., Pekowska, A., Fudenberg, G., Loe-Mie, Y., Fonseca, N.A., Huber, W., Haering, C.H., Mirny, L., et al. (2017). Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal. *Nature* *551*, 51–56.

Scully, R., Panday, A., Elango, R., and Willis, N.A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *20*, 698–714.

Seeber, A., Dion, V., and Gasser, S.M. (2013). Checkpoint kinases and the INO80 nucleosome remodeling complex enhance global chromatin mobility in response to DNA damage. *Genes Dev* *27*, 1999–2008.

Sexton, T., and Cavalli, G. (2015). The Role of Chromosome Domains in Shaping the Functional Genome. *Cell* *160*, 1049–1059.

Sexton, T., and Yaffe, E. (2015). Chromosome folding: driver or passenger of epigenetic state? *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*, a018721.

Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., Hoichman, M., Parrinello, H., Tanay, A., and Cavalli, G. (2012). Three-Dimensional Folding and Functional Organization Principles of the *Drosophila* Genome. *Cell* *148*, 458–472.

Shaltiel, I.A., Krenning, L., Bruinsma, W., and Medema, R.H. (2015). The same, only different – DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J Cell Sci* *128*, 607–620.

Shanbhag, N.M., Rafalska-Metcalf, I.U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S.M., and Greenberg, R.A. (2010). ATM-Dependent Chromatin Changes Silence Transcription In cis to DNA Double-Strand Breaks. *Cell* *141*, 970–981.

Shibata, A., Barton, O., Noon, A.T., Dahm, K., Deckbar, D., Goodarzi, A.A., Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2010). Role of ATM and the Damage Response Mediator Proteins 53BP1 and MDC1 in the Maintenance of G2/M Checkpoint Arrest. *MCB* *30*, 3371–3383.

Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J.H., Haber, J.E., and Lichten, M. (2004). Distribution and Dynamics of Chromatin Modification Induced by a Defined DNA Double-Strand Break. *Current Biology* *14*, 1703–1711.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sima, J., Chakraborty, A., Dileep, V., Michalski, M., Klein, K.N., Holcomb, N.P., Turner, J.L., Paulsen, M.T., Rivera-Mulia, J.C., Trevilla-Garcia, C., et al. (2019). Identifying cis Elements for Spatiotemporal Control of Mammalian DNA Replication. *Cell* 176, 816-830.e18.
- Simonetta, M., de Krijger, I., Serrat, J., Moatti, N., Fortunato, D., Hoekman, L., Bleijerveld, O.B., Altelaar, A.F.M., and Jacobs, J.J.L. (2018). H4K20me2 distinguishes pre-replicative from post-replicative chromatin to appropriately direct DNA repair pathway choice by 53BP1-RIF1-MAD2L2. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 17, 124–136.
- Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B., and de Laat, W. (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat. Genet.* 38, 1348–1354.
- Singatulina, A.S., Hamon, L., Sukhanova, M.V., Desforges, B., Joshi, V., Bouhss, A., Lavrik, O.I., and Pastré, D. (2019). PARP-1 Activation Directs FUS to DNA Damage Sites to Form PARG-Reversible Compartments Enriched in Damaged DNA. *Cell Rep* 27, 1809-1821.e5.
- van Sluis, M., and McStay, B. (2015). A localized nucleolar DNA damage response facilitates recruitment of the homology-directed repair machinery independent of cell cycle stage. *Genes & Development* 29, 1151–1163.
- van Sluis, M., and McStay, B. (2017). Nucleolar reorganization in response to rDNA damage. *Current Opinion in Cell Biology* 46, 81–86.
- Song, S.-H., and Kim, T.-Y. (2017). CTCF, Cohesin, and Chromatin in Human Cancer. *Genomics & Informatics* 15, 114–122.
- Sonoda, E., Zhao, G.Y., Kohzaki, M., Dhar, P.K., Kikuchi, K., Redon, C., Pilch, D.R., Bonner, W.M., Nakano, A., Watanabe, M., et al. (2007). Collaborative roles of γ H2AX and the Rad51 paralog Xrcc3 in homologous recombinational repair. *DNA Repair* 6, 280–292.
- Soutoglou, E., Dorn, J.F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G., and Misteli, T. (2007). Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nature Cell Biology* 9, 675–682.
- Srinivasan, M., Petela, N.J., Scheinost, J.C., Collier, J., Voulgaris, M., B Roig, M., Beckouët, F., Hu, B., and Nasmyth, K.A. (2019). Scc2 counteracts a Wapl-independent mechanism that releases cohesin from chromosomes during G1. *ELife* 8, e44736.
- Stam, M. (2019). 3D genome organization: a role for phase separation and loop extrusion? *Current Opinion in Plant Biology* 11.
- van Steensel, B., and Belmont, A.S. (2017). Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell* 169, 780–791.
- Stevens, T.J., Lando, D., Basu, S., Atkinson, L.P., Cao, Y., Lee, S.F., Leeb, M., Wohlfahrt, K.J., Boucher, W., O’Shaughnessy-Kirwan, A., et al. (2017). 3D structures of individual mammalian genomes studied by single-cell Hi-C. *Nature* 544, 59–64.
- Stiff, T., O’Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer Res* 64, 2390–2396.
- Strickfaden, H., McDonald, D., Kruhlak, M.J., Haince, J.-F., Th’ng, J.P.H., Rouleau, M., Ishibashi, T., Corry, G.N., Ausio, J., Underhill, D.A., et al. (2016). Poly(ADP-ribosylation-

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

dependent Transient Chromatin Decondensation and Histone Displacement following Laser Microirradiation. *J. Biol. Chem.* *291*, 1789–1802.

Strom, A.R., Emelyanov, A.V., Mir, M., Fyodorov, D.V., Darzacq, X., and Karpen, G.H. (2017). Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature* *547*, 241–245.

Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Cell* *123*, 1213–1226.

Szabo, Q., Bantignies, F., and Cavalli, G. (2019). Principles of genome folding into topologically associating domains. *Sci Adv* *5*.

Szczepińska, T., Rusek, A.M., and Plewczynski, D. (2019). Intermingling of chromosome territories. *Genes, Chromosomes and Cancer* *58*, 500–506.

Tang, J., Cho, N.W., Cui, G., Manion, E.M., Shanbhag, N.M., Botuyan, M.V., Mer, G., and Greenberg, R.A. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 317–325.

Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T.K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., et al. (2015). Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* *527*, 389–393.

Tsouroula, K., Furst, A., Rogier, M., Heyer, V., Maglott-Roth, A., Ferrand, A., Reina-San-Martin, B., and Soutoglou, E. (2016). Temporal and Spatial Uncoupling of DNA Double Strand Break Repair Pathways within Mammalian Heterochromatin. *Molecular Cell* *63*, 293–305.

Ui, A., Nagaura, Y., and Yasui, A. (2015). Transcriptional Elongation Factor ENL Phosphorylated by ATM Recruits Polycomb and Switches Off Transcription for DSB Repair. *Molecular Cell* *58*, 468–482.

Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J.E., and Koshland, D. (2004). DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol. Cell* *16*, 991–1002.

Vian, L., Pękowska, A., Rao, S.S.P., Kieffer-Kwon, K.-R., Jung, S., Baranello, L., Huang, S.-C., El Khattabi, L., Dose, M., Pruett, N., et al. (2018). The Energetics and Physiological Impact of Cohesin Extrusion. *Cell* *173*, 1165-1178.e20.

Vrouwe, M.G., Elghalbzouri-Maghrani, E., Meijers, M., Schouten, P., Godthelp, B.C., Bhuiyan, Z.A., Redeker, E.J., Mannens, M.M., Mullenders, L.H.F., Pastink, A., et al. (2007). Increased DNA damage sensitivity of Cornelia de Lange syndrome cells: evidence for impaired recombinational repair. *Human Molecular Genetics* *16*, 1478–1487.

Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B., and Elledge, S.J. (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* *298*, 1435–1438.

Ward, I.M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *J. Biol. Chem.* *276*, 47759–47762.

Warmerdam, D.O., and Kanaar, R. (2010). Dealing with DNA damage: Relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* *704*, 2–11.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Watrin, E., and Peters, J.-M. (2009). The cohesin complex is required for the DNA damage-induced G2/M checkpoint in mammalian cells. *EMBO J.* *28*, 2625–2635.
- Wendt, K.S., and Peters, J.-M. (2009). How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. *Chromosome Res* *17*, 201–214.
- Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiro, T., et al. (2008a). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* *451*, 796–801.
- Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiro, T., et al. (2008b). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* *451*, 796–801.
- de Wit, E., Vos, E.S.M., Holwerda, S.J.B., Valdes-Quezada, C., Verstegen, M.J.A.M., Teunissen, H., Splinter, E., Wijchers, P.J., Krijger, P.H.L., and de Laat, W. (2015). CTCF Binding Polarity Determines Chromatin Looping. *Mol. Cell* *60*, 676–684.
- Wutz, G., Várnai, C., Nagasaka, K., Cisneros, D.A., Stocsits, R.R., Tang, W., Schoenfelder, S., Jessberger, G., Muhar, M., Hossain, M.J., et al. (2017). Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. *The EMBO Journal* *36*, 3573–3599.
- Xie, A., Puget, N., Shim, I., Odate, S., Jarzyna, I., Bassing, C.H., Alt, F.W., and Scully, R. (2004). Control of Sister Chromatid Recombination by Histone H2AX. *Molecular Cell* *16*, 1017–1025.
- Yokochi, T., Poduch, K., Ryba, T., Lu, J., Hiratani, I., Tachibana, M., Shinkai, Y., and Gilbert, D.M. (2009). G9a selectively represses a class of late-replicating genes at the nuclear periphery. *PNAS* *106*, 19363–19368.
- Zhang, X., Zhang, Y., Ba, Z., Kyritsis, N., Casellas, R., and Alt, F.W. (2019a). Fundamental roles of chromatin loop extrusion in antibody class switching. *Nature* *575*, 385–389.
- Zhang, Y., Zhang, X., Ba, Z., Liang, Z., Dring, E.W., Hu, H., Lou, J., Kyritsis, N., Zurita, J., Shamim, M.S., et al. (2019b). The fundamental role of chromatin loop extrusion in physiological V(D)J recombination. *Nature* *573*, 600–604.
- Zhao, Z., Tavoosidana, G., Sjölander, M., Göndör, A., Mariano, P., Wang, S., Kanduri, C., Lezcano, M., Sandhu, K.S., Singh, U., et al. (2006). Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat. Genet.* *38*, 1341–1347.
- Zhu, S., Paydar, M., Wang, F., Li, Y., Wang, L., Barrette, B., Bessho, T., Kwok, B.H., and Peng, A. (2020). Kinesin Kif2C in regulation of DNA double strand break dynamics and repair. *ELife* *9*, e53402.
- Zimmermann, M., and Lange, T. de (2014). 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends in Cell Biology* *24*, 108–117.
- Zimmermann, M., Lottersberger, F., Buonomo, S.B., Sfeir, A., and de Lange, T. (2013). 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science* *339*, 700–704.
- Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Shiloh, Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol* 8, 870–876.

ANNEXES

ANNEXES

Au cours de ces 4 années de thèse j'ai également eu la chance d'écrire une revue avec Gaëlle Legube sur le rôle de la conformation de la chromatine dans la réparation des DSB, d'écrire un article de méthode avec Vincent Rocher et Gaëlle Legube indiquant comment identifier les DSB réparés préférentiellement par recombinaison homologue à l'échelle du génome entier et enfin de participer à d'autres projets de recherche au sein de l'équipe.

Lors de ma première année de thèse, Béatrix Bugler et moi avons réalisé des expériences de microscopie à haut-débit afin d'identifier des acteurs du regroupement des DSB (Aymard et al., 2017 NSMB). En effet, la mesure du nombre et de l'aire des foyers γ H2AX en immunofluorescence dans des milliers de cellules nous a permis d'identifier les protéines de la réparation NBS1 et MRE11, ainsi que les protéines du cytosquelette FMN2 et SUN2 comme des acteurs du regroupement des DSB.

Lors de ma seconde année de thèse, j'ai pu participer aux révisions de l'article Clouaire et al., 2018 (Molecular Cell). J'ai en effet réalisé des CHIP-seq des protéines de la réparation Rad51 et XRCC4 à différents temps après induction des DSB (1h, 4h et 24h de traitement de 4OHT). Ceci a permis de montrer que l'identité des DSB induites dans notre système est la même, quel que soit le temps d'induction des DSB et de valider nos catégories de DSB identifiées comme étant réparées préférentiellement par HR ou par NHEJ. Les résultats concernant Rad51 n'ont finalement pas été inclus dans cet article mais ont été ajoutés à un article de l'équipe déposé sur BioRxiv (Cohen, Guenolé et al., 2020).

Enfin, au cours de ma 3^{ème} année de thèse, j'ai participé aux révisions de l'article Marnef et al., 2019 (Genes and Dev). Par exemple, j'ai réalisé des expériences d'immunofluorescence afin de tester le rôle de différents candidats sur la formation des CAPs, tels que les microtubules (en utilisant du Nocodazole), SMC3 et RPA (en utilisant des siRNA). J'ai également testé en immunofluorescence l'accumulation de RPAS33 dans le nucléole dans différentes conditions telles qu'après différents temps de traitement d'Actinomycine D, combiné ou non avec un traitement de 4OHT. Enfin j'ai marqué en immunofluorescence et quantifié les invaginations de la membrane nucléaire dans de nombreuses conditions (ActD, OHT, après siRNA...).



The Secret Life of Chromosome Loops upon DNA Double-Strand Break

Coline Arnould and Gaëlle Legube

LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative (CBI), CNRS, Université de Toulouse, UT3, Toulouse, France

Correspondence to Gaëlle Legube: gaelle.legube@univ-tlse3.fr

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.036>

Abstract

DNA double-strand breaks (DSBs) are harmful lesions that severely challenge genomic integrity, and recent evidence suggests that DSBs occur more frequently on the genome than previously thought. These lesions activate a complex and multilayered response called the DNA damage response, which allows to coordinate their repair with the cell cycle progression. While the mechanistic details of repair processes have been narrowed, thanks to several decades of intense studies, our knowledge of the impact of DSB on chromatin composition and chromosome architecture is still very sparse. However, the recent development of various tools to induce DSB at annotated loci, compatible with next-generation sequencing-based approaches, is opening a new framework to tackle these questions. Here we discuss the influence of initial and DSB-induced chromatin conformation and the strong potential of 3C-based technologies to decipher the contribution of chromosome architecture during DSB repair.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

The DNA Double-Strand Break Response and Repair

DNA double-strand breaks (DSBs) represent challenging lesions for cells, as they can lead to major genome rearrangement such as translocations, aneuploidy, and deletions/amplifications. While previously considered to be almost exclusively induced by environmental agents (radiation, chemicals) with the exception of programmed induction by endogenous nucleases (during meiosis and immunoglobulin loci rearrangement), it is now well admitted that DSBs are also regularly triggered during normal cell metabolism. More specifically, the development of DSB mapping technologies, such as BLESS, BLISS, DSBCapture, END-seq or BrITL [1–6] (reviewed in Ref. [7]), has recently revealed insights on the distribution of endogenous DSBs across the genome. These genome-wide analyzes identified transcriptionally active loci and transcription start sites (TSS) as particularly prone to

breakage (e.g., Refs. [3,6], reviewed in Refs. [7,8]). These studies also further revealed a compelling connection between DSB production and chromosome architecture, identifying binding sites for CTCF and cohesin (main genome organizers) as preferential damage sites due to topoisomerase activity and/or fork collapse [5,9–12]. At loop anchors, topoisomerase II recruitment could further trigger production of DSB upon transcriptional activation of close-by genes [9–11].

Beyond the influence of chromosome loops in DSB formation, supported by a growing body of evidence, an emerging concept is also that DSB formation further modifies chromosome architecture and organization in the nuclear space. Given the potential for unscheduled rejoining of two DSBs to trigger translocations, and the previously reported bias for translocation to occur in active loci in cancer cells, it is urgent to understand how DSBs modify chromosome organization and architecture and how this impacts genome (in)stability.

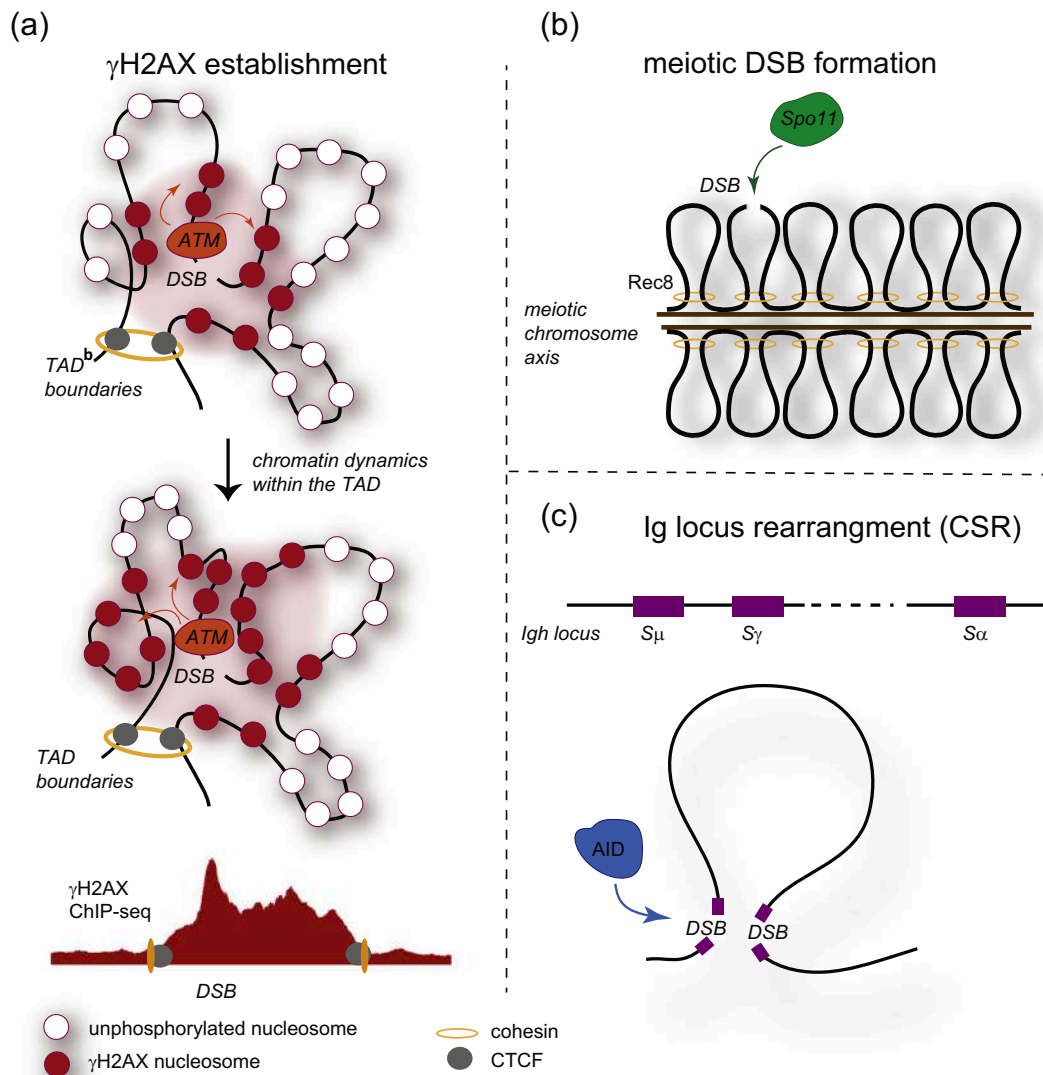


Fig. 1. Contribution of the initial chromatin conformation into γ H2AX establishment and programmed DSB induction and repair. (A) The initial chromosome conformation may dictate γ H2AX spreading following DSB induction. In this model, ATM, the main H2AX kinase is locally recruited at the DSB. Once bound, it is able to phosphorylate H2AX containing nucleosomes brought to its physical proximity, thanks to chromatin dynamics that takes place within the TAD. Sustained signaling and ATM activation eventually trigger the phosphorylation of H2AX on the entire TAD. In this model, γ H2AX distribution, as observed by ChIP-seq, should mimic the 3D chromatin conformation. (B) Chromosome conformation is critical during meiotic breaks formation by Spo11. During prophase, meiotic chromosomes are strongly reorganized with the formation of DNA loops anchored to a proteinaceous axis. Spo11 generates DSBs within DNA loops, which can further pair with the homologous chromosome in order to produce crossover and to complete meiosis. The 3D chromatin structure and the chromosomal axis are required for both DSB production by Spo11 and to ensure the “homologous bias” (i.e., the choice of the homologous chromosome rather than the sister chromatid, as a template for HR). (C) Chromosome conformation is also critical for the rearrangements that occur on immunoglobulin loci, in order to generate immunoglobulin isotypes (class switch recombination (CSR)) and the antibody repertoire (VDJ recombination). For example, during CSR (shown here), the long-range physical interactions between switch (S) sequences on the heavy chain locus (*Igh*) allow two DSBs to be rejoined.

Various pathways contribute to repair DSB in eukaryotes, including homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) (reviewed in Refs. [13,14]). HR entails processing of DNA ends in order to generate single strand DNA

(resection) which will invade a homologous copy of the broken locus, further used as template for DNA synthesis. NHEJ rather directly rejoins the two DNA ends. Mechanistically, these two pathways are profoundly different and likely necessitate different

chromatin composition and properties for proper execution. At a molecular level, ChIP-seq and imaging studies have started to determine the histone modifications landscape assembled at DSB, as well as their function in DSB repair (reviewed in Ref. [15]). However, the conformation of chromatin around DSBs and the chromosome organization in damaged nuclei have only recently started to be investigated.

One of the striking feature of the DNA damage response is the assembly of microscopically visible foci in the nucleus, which display massive phosphorylation of the H2AX histone variant (γ H2AX) [16], as well as accumulation of repair factors. Although efforts have been made to understand the protein content of these foci, their exact composition and conformation at the DNA level is still unknown. One of the main reasons for this scarcity of data stands in the long-lasting inability to control the position of induced DSB on the genome. Indeed, except in yeast where the ability of the HO endonuclease to cleave the MAT locus for mating type switching was utilized as a tool to investigate site-specific DSB repair, DSBs have routinely been induced by exposure to genotoxic (drugs and radiation) generating damage in a heterogeneous manner in the cell population and at unknown (but not necessarily random) positions, which precluded the use of Chromosome Conformation Capture (3C)-based methods to investigate chromatin conformation around DSBs. This has been solved recently, thanks to the development of several tools to induce breaks at annotated positions, using restriction enzymes and homing endonucleases (e.g., AsiSI, I-PpoI), Zinc Fingers and TALE Nucleases, or the CRISPR/Cas9 system [17]. With these novel experimental systems, the molecular characterization of DNA conformation around DSB and more generally the folding of damaged chromosomes within the nucleus are now within reach.

Two main questions should primarily focus our attention. First, we need to understand how the initial chromosome conformation and organization in the nucleus may contribute to ensure proper DSB signaling and repair. Second, we shall wonder how this initial chromatin conformation is modified upon damage to participate in repair events safeguarding genome integrity.

How Does Initial Chromatin Architecture Contribute to DSB Signaling and Repair?

The genomic localization of DSBs strongly impacts their signalization and repair. For instance, clear evidence suggests that DSB occurring in heterochromatin [18,19], rDNA [20] or transcribed loci [8] displays

specialized repair pathways. The chromatin composition of the broken locus (involving for example histone marks like H3K36me3 for transcription-coupled DSB repair [21–23], or *bona fide* chromatin constituents such as KAP1 for heterochromatic repair [24,25]) and its spatial position within the nucleus (e.g., at the nuclear periphery [26]) have been clearly established as main contributors in determining which pathway should be used at each genomic location (a decision known as “DSB repair pathway choice”) [27]. However, at this stage it is not known whether, beyond the sub-nuclear localization of a locus and its chromatin composition, the chromosome conformation also plays a role in DSBs signaling and repair. Nevertheless, some hints suggest that this is likely the case.

Initial chromatin conformation regulates HR

The fact that chromosome conformation within the nucleus regulates HR is particularly evident from studies in yeast, showing that efficiency of sub-telomeric recombination is strongly affected by telomeres clustering and anchorage [28,29]. Beyond telomeres, moving an HO site at different positions along yeast chromosomes revealed a compelling correlation between the frequency of HR and the proximity with the homologous locus, observed by 3C before damage induction [30]. Thus, initial spatial proximity between the broken locus and a donor sequence is a key feature that determines the efficiency of HR.

Initial chromatin conformation could regulate γ H2AX spreading

Evidence also suggests that chromosome architecture might control γ H2AX spreading (reviewed in Refs. [31,32]) (Fig. 1). Indeed, γ H2AX mapping by ChIP-chip around multiple DSBs induced by the restriction enzyme AsiSI in human cells (the so-called DivA cell line for DSB Induced via AsiSI) revealed that γ H2AX spreads on 1-2 megabases surrounding DSBs, in a manner that is (i) reproducible and constrained within boundaries, (ii) not necessary symmetrical around the break and (iii) uneven with peaks and valleys, suggesting that the surrounding epigenomic landscape and/or chromatin architecture may regulate γ H2AX spreading [33]. A follow-up study uncovered a potential function for cohesins in regulating γ H2AX distribution and in insulating transcribed genes encompassed in γ H2AX domains from transcription extinction [34]. Moreover, by then, comparison of published Hi-C data generated in undamaged cells [35] with γ H2AX domains boundaries revealed a striking tendency of γ H2AX spreading to stop at topologically associating domain (TAD) boundaries [34]. In agreement, the occupancy of the chromatin looping factor CTCF was found juxtaposed to γ H2AX foci using super-resolution light microscopy [36]. Altogether, these

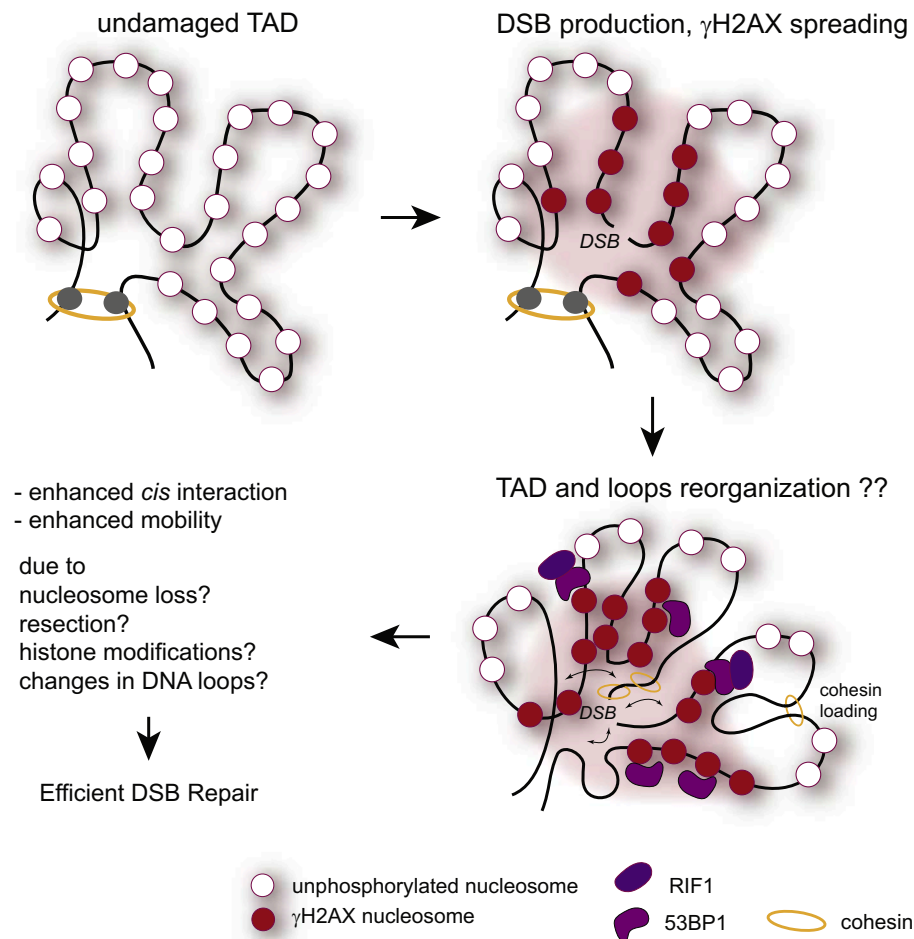


Fig. 2. DSB-induced modification(s) of the chromosome conformation *in cis* to the break. Following DSB production and γ H2AX spreading, the 3D conformation of damaged TAD could also be modified, due to the binding of cohesin, CTCF or repair proteins with potential function in chromatin architecture such as 53BP1 and RIF1. The DSB-induced histones modifications (including γ H2AX spreading), nucleosome loss or/and generation of single strand DNA (resection) may also collectively change the dynamics of chromatin within TADs. Altogether, these changes could translate in enhanced mobility and efficient DSB repair.

results raise the exciting hypothesis that once bound to the DSB, the kinase(s) involved in H2AX phosphorylation allows γ H2AX spreading by modifying nucleosomes brought into spatial proximity, thanks to the initial chromatin architecture surrounding the DSB (the “Intra-TAD model” [31,32]) rather than by linearly walking along the chromosome. This hypothesis is further supported in yeast, where γ H2A spreading was also found to occur *in trans* (on other chromosomes) when a DSB was induced close to a centromere, as a consequence of centromeres clustering within nuclei [37].

Initial chromatin conformation regulates production and repair of programmed DSB

Beyond these evidences that pre-existing chromosome architecture contributes to DSB signaling and repair, chromosome organization is also likely a

key feature in the repair of programmed DSBs induced during meiosis and immunoglobulin loci rearrangements (Fig. 1). During the prophase of meiosis, chromosomes undergo profound reorganization which entails progressive condensation, loss of long-range inter-chromosomal contacts, TADs dissolution and the formation of arrays of chromatin loops anchored to a chromosomal axis [38–43]. Within this context, the topoisomerase-like Spo11 endonuclease induces DSBs in a tightly regulated manner, which are further processed and—for some of them—converted into mature crossovers, necessary to ensure chromosome segregation and completion of meiosis. Importantly, crossover formation depends on the “homologous bias” that consists in choosing the homologous chromosome as a template over the sister chromatid (reviewed in Refs. [44,45]). Notably, germ cells-specific chromosome architecture plays a critical role in both determining

the distribution of DSBs along the chromosome and in the homologous bias. Indeed, in *Saccharomyces cerevisiae*, Spo11-dependent DSBs are being formed within DNA loops in a manner that depends on multiple axial factors such as the meiosis-specific cohesin subunit Rec8 [46,47], the Spp1 protein [48], Red1 [46], or the Spo11 accessory complex, RRM (Rec114–Mei4–Mer2) [49]. In addition, components of the structural axis (such as Rec8 or Red1) are also strongly involved in regulating the homologous bias [47] and the axis further acts as a platform for recombination. This peculiar chromosome architecture that is assembled in meiotic cells hence displays a prominent role into DSB production and repair.

Programmed DSBs also occur at the Immunoglobulin (Ig) loci to ensure V(D)J recombination for antibody diversification and class switch recombination (CSR) to generate different antibody isotypes. On the Ig heavy-chain locus (*Igh*), productive CSR results in a deletion event after recombination between two Switch (S_H) sequences, located up to 100 kb apart. Here as well, the initial 3D chromatin conformation exerts a regulatory role on both break formation and repair [50,51] (reviewed in Ref. [52]). For instance, deletion of the CTCF-binding sites encompassed in the *Igh* Superanchor (SA), correlates with a decrease in cohesin-mediated loop extrusion (detected by “stripes” on Hi-C maps) and reduces CSR [50]. Similarly, V(D)J recombination, both on *Igk* and *Igh* loci, strongly relies on long-range chromatin interactions. For instance, deletion of CTCF-binding sites in the intergenic control region-1 (IGCR1) upstream the D segments on *Igh* locus impairs normal V to DJ recombination and B-cell development in a manner that coincides with modification of chromosomal loops [53,54]. Similarly, deletion of a specific enhancer-CTCF-bound element on the *Igk* locus perturbs the antibody repertoire in a manner that also correlates with the loss of long-range interaction [55].

It is hence clear from all these studies that the initial chromosome architecture contributes to DSB signaling, processing and repair. However, while our knowledge regarding the role of long-range chromatin interactions and TADs during repair of programmed DSBs quickly expands, our understanding of their function into repair of endogenous DSBs in somatic cells still lags behind and will necessitate future 3C-based studies using sequence-specific DSB induction systems.

How Does Chromatin Architecture Change Post-damage *In Cis* to DSB, within γ H2AX Domains?

Another important question that needs to be addressed is the nature of the changes in chromosome architecture following damage (Fig. 2). Indeed, DSB-induced modifications in the size of DNA loops

or the position of TADs boundaries could regulate chromatin flexibility (stiffness), thereby regulating the DSB mobility in the nucleus [56]. This could also help to “bury” (i.e., protect) the DSB from its environment, which therefore may have profound impacts on translocation biogenesis, partner choice for HR and more generally on genome integrity. Plenty of evidence supports that chromatin *in cis* to DSB displays a different behavior in terms of mobility, rigidity and compaction (reviewed in Refs. [31,57]). In particular, laser-mediated, localized damage triggers a rapid chromatin decompaction at the sites of breaks [58–60], in agreement with observations that γ H2AX foci displays decondensed-like appearance [61,62], suggesting that indeed a DSB induces dramatic changes in chromatin conformation *in cis*. However, nearly all studies were performed using imaging, and our current knowledge of DSB-promoted 3D changes at the level of DNA sequence remains incredibly sparse. The first experiment using 3C methodology to assess *cis* modification of long-range interactions was performed in yeast following induction of a single DSB within the MAT locus by the HO endonuclease [63]. Strikingly long-range contacts were dramatically reduced following DSB in asynchronous cells, while such a decrease was not observed in G1-arrested cells [63], suggesting that end-processing (which occurs specifically in S/G2) rather than γ H2A spreading and checkpoint activation (occurring all throughout the cell cycle) was responsible for decreased chromosomal contacts. Reduced chromosome interaction frequency was further shown to depend on Rad51 loading and attributed to the sequestration of the DSB at the nuclear periphery [63,64] (see next section). However, this decrease in long-range interaction following DSB was not reported in human cells [65]. Instead, by using Capture Hi-C in the DlvA system (in which ~100 DSBs can be induced at annotated loci [21,33]), it was shown that, in average, the DSB itself engages more long-range contacts with neighboring sequences encompassed in γ H2AX domains than before break induction [65] (reviewed in Ref. [66]). Contrary to yeast, DSBs have not been found to relocate to the nuclear envelope in mammalian cells, which may account for the discrepancy between both studies. Notably, enhanced interactions between the DSB and DNA loci embedded in γ H2AX domains would be in agreement with the increased mobility of DNA ends reported in multiple studies (reviewed in Refs. [31,57,67]).

Of note, the resolution achieved by Capture-HiC in the above-mentioned study [65] was insufficient to draw conclusions regarding the DNA loops reorganization around DSBs. Interestingly, although this was not directly assessed using Hi-C or 4C experiment, strong evidence suggests that chromosome loops are reorganized *in cis* to DSB induced by

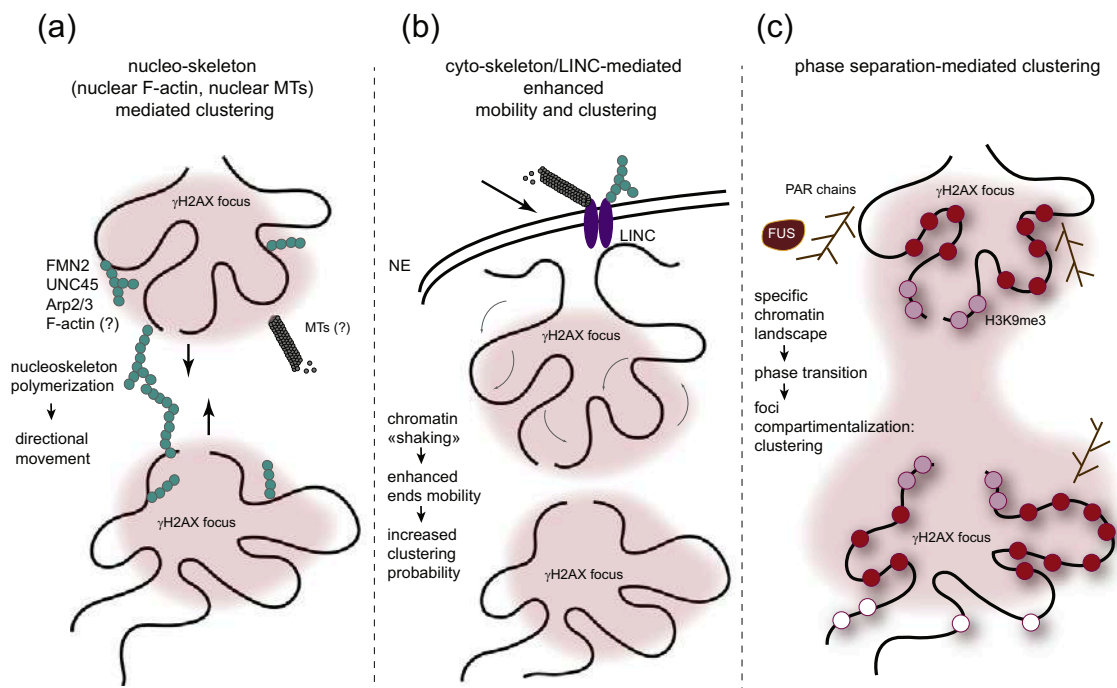


Fig. 3. Changes in chromosome conformation upon damage *in trans* such as during DSB clustering. Both live cell imaging and 3C-based methods allowed to demonstrate that multiple DSBs can coalesce together within a single γ H2AX focus. However, the mechanisms that ensure clustering are unclear and may entail various pathways. (A) The nucleoskeleton (both polymerized actin and/or microtubules) could allow for DSB mobilization and clustering in a directional manner. (B) The cytoskeleton could also contribute to clustering thanks to the transmission of forces from cytoskeleton to chromatin via the LINC complex, embedded in the nuclear envelope. In this context, the forces transmitted to chromatin may trigger a general increase in chromatin dynamics, increasing the probability of γ H2AX collision/clustering. (C) Finally, the chromatin landscape established following damage could allow for compartmentalization, thanks to phase separation.

Spo11 in yeast meiotic cells. Indeed, in a WT strain, DSB production by Spo11 is negatively counteracted in a ~ 100 -kb window around an initial Spo11-created break. Notably, this phenomenon, called negative interference, depends on the yeast ATM ortholog Tel1, one of the main kinases activated during the DNA damage response [68]. This led to the proposal that, *in cis* to an initial break, ATM/Tel1 activation could drive chromatin loops reorganization, themselves being required and targeted for DSB formation (see previous section), hence contributing to negative interference and ensuring a proper distribution of DSBs along meiotic chromosomes [68,69].

It is likely that the usual suspects shaping chromosome architecture, that is, the cohesin complex and CTCF, are involved in such DSB-induced DNA loops reorganization. Studies in both yeast and mammals have demonstrated that cohesins and their loaders/regulators are recruited at DSBs [34,70–81], and post-translationally modified following damage (e.g., Refs. [76,77,82–85]). Strikingly, in yeast, DSB-induced cohesin binding takes place on a large chromosomal domain surrounding

the break [71,72], in contrast to mammalian cells, where it only occurs on few kilobases [34]. While cohesin loading has long been involved in sister chromatid cohesion during HR [75,83,84,86–90], in mammalian cells, it is also recruited at DSBs during G1 phase [34,74], suggesting that this complex exerts a function beyond sister chromatid cohesion at DSB. In agreement, cohesin regulates transcriptional repression of genes immediately *in cis* to DSBs [74], insulates the active genes located farther within the γ H2AX domain to maintain their transcription [34] and controls the NHEJ repair pathway [91]. Similarly, CTCF has also been shown to be recruited at DSBs [92–94] and to contribute to HR [92,93].

Beyond these well-known architectural proteins involved in chromatin looping, DSB repair factors may also contribute to shape chromatin 3D structure *in cis* to DSB. Among these, 53BP1 is an interesting candidate since it was shown to spread on entire γ H2AX domains [95] and to be a critical determinant of the architecture of the *Igh* locus, even before damage formation [51,96]. In addition, the 53BP1 effector Rif1, which is recruited at DSB to regulate resection [97–99], is also of interest, as it was

recently shown by 4C-seq to be a main organizer of chromatin architecture in unchallenged cells [100]. Importantly, both factors are essential for productive CSR [97,98,101,102], which further highlight their potential role in organizing the 3D structure of DSB-surrounding chromatin.

However, despite all these studies, a clear picture of the DNA conformation within γ H2AX foci is still awaited. Mapping of architectural proteins using ChIP-seq as well as determining chromatin conformation by 3C-based approaches around annotated DSBs will certainly help to better understand the nature and function of DSB-induced chromosome loops changes.

How Does Chromatin Architecture Change Post-damage *In Trans* to DSB, within the Nucleus?

In addition to the changes *in cis* described in the previous section, damaged chromosomes also experience more global reorganization within the nucleus. This is particularly apparent in yeast and *Drosophila*, where persistent, heterochromatic and/or rDNA breaks are relocalized at the nuclear periphery [63,64,103,104] (reviewed in Ref. [31]). Similarly in mammals, DSBs induced in rDNA and α satellites are extruded at the periphery of the nuclear sub-compartment (nucleolus and heterochromatic focus, respectively) [105–107]. Beyond these large-scale reorganizations, DSBs are also capable of clustering together (i.e., regrouping in one visible focus [65,108–115] (reviewed in Refs. [31,116])). Using Capture Hi-C to map long-range interactions following induction of multiple annotated DSBs on the human genome, it was recently demonstrated that DSBs can cluster together if they occur in transcriptionally active, RNA Pol II-bound, loci [65] (reviewed in Refs. [8,15,116]). Of interest, clustering was mostly observed in G1 cells [65,108] and coincided with delayed repair [65], suggesting that it may contribute in “poising” DSB repair in order to ensure faithful genetic information recovery [65,116].

The mechanism(s) at work to ensure DSB clustering and other DSB mobility events are still under investigation but may rely on both active/directional and passive/diffusive movement (Fig. 3).

Cyto and nucleo-skeleton networks

Evidence suggests that DSB end mobility and DSB clustering are mediated at least in part, thanks to the cyto- and nucleo-skeleton network (reviewed in Refs. [116,117]). Indeed, formin 2, an actin organizer, as well as the Arp2/3 actin branching factor and the Arp2/3 activator WASP are required for clustering in human cells [65,114] (Fig. 3, left panel).

Moreover, nuclear myosin 1 and actin were recently reported as mediating damaged-induced homologous chromosome pairing in G0/G1 cells, in a manner that depends on the ability of actin to polymerize (by the use of actin mutants) [118]. Of importance, although nuclear actin filaments (F-actin) have been reported and involved in relocating heterochromatic DSBs in *Drosophila* nuclei [119], such actin filaments still remain to be observed in mammalian nuclei. Indeed, DNA damaging agents do induce nuclear F-actin [120], but no clear link with damage sites was reported. More recently, actin was described to form foci colocalizing with γ H2AX rather than filaments following damage [114]. Hence, the contribution of nuclear F-actin during clustering still needs further clarification. On another hand, the microtubule (MTs) network may also contribute to DSB mobility and clustering. Perturbation of MTs using drugs impairs DNA ends mobility [121,122], although this was not observed in other settings [115,123]. Moreover, nuclear MTs were observed in yeast damaged nuclei and proposed to mediate directional movement [124]. While DSB-induced nuclear MTs still need to be identified in other conditions and organisms, it is nevertheless clear from many studies that the LINC complex, embedded in the nuclear envelope and connecting the cytoskeleton (including cytoplasmic MTs) to nuclear lamina and chromatin, also controls DSB mobility and clustering [65,121] (reviewed in Refs. [31,116]). It was therefore proposed that the cytoskeleton may also contribute to DSB mobility and clustering by transmitting forces from the cytoplasm to chromatin through the nuclear envelope and the LINC complex [121] (reviewed in Ref. [116]) (Fig. 3, middle panel).

Contribution of phase separation in compartmentalization

It is also tempting to speculate that phase separation could contribute into DSB clustering, as reported for heterochromatin foci formation (Fig. 3, right panel). Indeed, H3K9me3 covered chromatin tends to phase separate, thanks to the contribution of heterochromatin protein 1 (HP1) [125,126]. In this respect, it is of interest that HP1 is involved in DSB repair and recruited at DSB [79,127–132]. Moreover, DNA damage foci were found to form liquid-like compartments in a manner that is seeded by poly-ADP-ribose polymerase (PARP) activity and by the formation of poly-ADP-ribose (PAR) chains [133], as well as by the contribution of the low-complexity domain RNA binding proteins, such as FUS [134]. Notably, a recent study reported that 53BP1 foci display droplet-like behavior, and that their assembly, fusion and dissociation are phase separation dependent [135]. Hence, the chromatin landscape established *in cis* to DSB (including histone modifications but also low-complexity

domain proteins, or other repair proteins recruitment at sites of damage) may contribute to compartmentalize DSB repair sites through a phase separation-driven mechanism.

Concluding Remarks

While our knowledge of the nature and function of chromatin during DSB repair recently greatly expanded, more studies are now necessary to understand the nature and function of chromatin conformation in these processes. Importantly, modifications of chromosome looping likely display essential function in safeguarding genome integrity and driving genome evolution. For instance, chromosome architecture is strongly linked to the generation of translocation involving the *Igh* locus [136], and DSB clustering is a key player in translocation biogenesis [137]. In conclusion, time has now come to make use of the ever growing, sequencing-based, methodologies designed to investigate chromosome architecture at the highest achievable resolution, to tackle the function of chromatin conformation and looping in genome stability.

Acknowledgments

We apologize to our colleagues whose works could not be included in this review owing to space limitations. The G.L. laboratory is funded by grants from the European Research Council (ERC-2014-CoG 647344), Agence Nationale pour la Recherche (ANR-14-CE10-0002-01 and ANR-18-CE12-0015-02), the Institut National contre le Cancer (INCA), and the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC).

Declaration of Competing Interest

The authors have no competing interest to declare.

Received 23 May 2019;

Received in revised form 24 July 2019;

Accepted 30 July 2019

Available online 8 August 2019

Keywords:

DNA double-strand breaks repair;
DSB clustering;
γH2AX;
chromatin;
topologically associating domains

Abbreviations used:

DSB, DNA double-strand break; TSS, transcription start site; HR, homologous recombination; NHEJ, non-homologous end joining; 3C, Chromosome Conformation Capture; TAD, topologically associating domain; CSR, class switch recombination; MT, microtubule.

References

- [1] W.X. Yan, R. Mirzazadeh, S. Garnerone, D. Scott, M.W. Schneider, T. Kallas, et al., BLISS is a versatile and quantitative method for genome-wide profiling of DNA double-strand breaks, *Nat. Commun.* 8 (2017) 15058, <https://doi.org/10.1038/ncomms15058>.
- [2] A. Biernacka, Y. Zhu, M. Skrzypczak, R. Forey, B. Pardo, M. Grzelak, et al., i-BLESS is an ultra-sensitive method for detection of DNA double-strand breaks, *Commun Biol* 1 (2018) 181, <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0165-9>.
- [3] N. Crosetto, A. Mitra, M.J. Silva, M. Bienko, N. Dojer, Q. Wang, et al., Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing, *Nat. Methods* 10 (2013) 361–365, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2408>.
- [4] A. Canela, S. Sridharan, N. Sciascia, A. Tubbs, P. Meltzer, B.P. Sleckman, et al., DNA breaks and end resection measured genome-wide by end sequencing, *Mol. Cell* 63 (2016) 898–911, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.034>.
- [5] N. Shastri, Y.-C. Tsai, S. Hile, D. Jordan, B. Powell, J. Chen, et al., Genome-wide identification of structure-forming repeats as principal sites of fork collapse upon ATR inhibition, *Mol. Cell* 72 (2018) 222–238.e11, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.047>.
- [6] S.V. Lensing, G. Marsico, R. Hänsel-Hertsch, E.Y. Lam, D. Tannahill, S. Balasubramanian, DSBCapture: in situ capture and sequencing of DNA breaks, *Nat. Methods* 13 (2016) 855–857, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3960>.
- [7] N. Puget, K. Miller, G. Legube, Non-canonical DNA/RNA structures during transcription-coupled double-strand break repair: roadblocks or bona fide repair intermediates? *DNA Repair (Amst)* 102661 (2019) <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102661>.
- [8] A. Marnef, S. Cohen, G. Legube, Transcription-coupled DNA double-strand break repair: active genes need special care, *J. Mol. Biol.* 429 (2017) 1277–1288, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.024>.
- [9] A. Canela, Y. Maman, S.-Y.N. Huang, G. Wutz, W. Tang, G. Zagnoli-Vieira, et al., Topoisomerase II-induced chromosome breakage and translocation is determined by chromosome architecture and transcriptional activity, *Mol. Cell* (2019) <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.030>.
- [10] A. Canela, Y. Maman, S. Jung, N. Wong, E. Callen, A. Day, et al., Genome organization drives chromosome fragility, *Cell* 170 (2017) 507–521.e18, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.034>.
- [11] H.J. Gothe, B.A.M. Bouwman, E.G. Gusmao, R. Piccinno, G. Petrosino, S. Sayols, et al., Spatial chromosome folding and active transcription drive DNA fragility and formation of oncogenic MLL translocations, *Mol. Cell* (2019) <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.015>.
- [12] R. Madabhushi, F. Gao, A.R. Pfenning, L. Pan, S. Yamakawa, J. Seo, et al., Activity-induced DNA breaks

- govern the expression of neuronal early-response genes, *Cell* 161 (2015) 1592–1605, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.032>.
- [13] E. Mladenov, S. Magin, A. Soni, G. Iliakis, DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: cell cycle and proliferation-dependent regulation, *Semin. Cancer Biol.* 37-38 (2016) 51–64, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.03.003>.
- [14] R. Scully, A. Panday, R. Elango, N.A. Willis, DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2019)<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>.
- [15] T. Clouaire, G. Legube, A snapshot on the cis chromatin response to DNA double-strand breaks, *Trends Genet.* 35 (2019) 330–345, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.02.003>.
- [16] E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, W.M. Bonner, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5858–5868, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>.
- [17] V. Mladenova, E. Mladenov, G. Iliakis, Novel biological approaches for testing the contributions of single dsbs and DSB clusters to the biological effects of high LET radiation, *Front. Oncol.* 6 (2016) 163, <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00163>.
- [18] A. Fortuny, S.E. Polo, The response to DNA damage in heterochromatin domains, *Chromosoma* 127 (2018) 291–300, <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0669-6>.
- [19] C. Lemaître, E. Soutoglou, Double strand break (DSB) repair in heterochromatin and heterochromatin proteins in DSB repair, *DNA Repair (Amst)* 19 (2014) 163–168, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.015>.
- [20] M. van Sluis, B. McStay, Nucleolar reorganization in response to rDNA damage, *Curr. Opin. Cell Biol.* 46 (2017) 81–86, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.03.004>.
- [21] F. Aymard, B. Bugler, C.K. Schmidt, E. Guillou, P. Caron, S. Briois, et al., Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014) 366–374, <https://doi.org/10.1038/nsmb.2796>.
- [22] S.X. Pfister, S. Ahrabi, L.-P. Zalmas, S. Sarkar, F. Aymard, C.Z. Bachrati, et al., SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability, *Cell Rep.* 7 (2014) 2006–2018, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.026>.
- [23] M. Daugaard, A. Baude, K. Fugger, L.K. Povlsen, H. Beck, C.S. Sørensen, et al., LEDGF (p75) promotes DNA-end resection and homologous recombination, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19 (2012) 803–810, <https://doi.org/10.1038/nsmb.2314>.
- [24] Y. Ziv, D. Bielopolski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D.C. Schultz, et al., Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 870–876, <https://doi.org/10.1038/ncb1446>.
- [25] A.A. Goodarzi, T. Kurka, P.A. Jeggo, KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 831–839, <https://doi.org/10.1038/nsmb.2077>.
- [26] C. Lemaître, A. Grabarz, K. Tsouroula, L. Andronov, A. Furst, T. Pankotai, et al., Nuclear position dictates DNA repair pathway choice, *Genes Dev.* 28 (2014) 2450–2463, <https://doi.org/10.1101/gad.248369.114>.
- [27] T. Clouaire, G. Legube, DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision? *Nucleus* 6 (2015) 107–113, <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1010946>.
- [28] A. Batté, C. Brocas, H. Bordelet, A. Hocher, M. Ruault, A. Adjiri, et al., Recombination at subtelomeres is regulated by physical distance, double-strand break resection and chromatin status, *EMBO J.* 36 (2017) 2609–2625, <https://doi.org/10.15252/embj.201796631>.
- [29] N. Agmon, B. Liefshitz, C. Zimmer, E. Fabre, M. Kupiec, Effect of nuclear architecture on the efficiency of double-strand break repair, *Nat. Cell Biol.* 15 (2013) 694–699, <https://doi.org/10.1038/ncb2745>.
- [30] C.-S. Lee, R.W. Wang, H.-H. Chang, D. Capurso, M.R. Segal, J.E. Haber, Chromosome position determines the success of double-strand break repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E146–E154, <https://doi.org/10.1073/pnas.1523660113>.
- [31] A. Marnef, G. Legube, Organizing DNA repair in the nucleus: DSBs hit the road, *Curr. Opin. Cell Biol.* 46 (2017) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.12.003>.
- [32] F. Aymard, G. Legube, A TAD closer to ATM, *Molecular & Cellular Oncology* 3 (2016), e1134411. <https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1134411>.
- [33] J.S. Iacovoni, P. Caron, I. Lassadi, E. Nicolas, L. Massip, D. Trouche, et al., High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome, *EMBO J.* 29 (2010) 1446–1457, <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.38>.
- [34] P. Caron, F. Aymard, J.S. Iacovoni, S. Briois, Y. Canitrot, B. Bugler, et al., Cohesin protects genes against γH2AX Induced by DNA double-strand breaks, *PLoS Genet.* 8 (2012), e1002460. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002460>.
- [35] E. Lieberman-Aiden, N.L. van Berkum, L. Williams, M. Imakaev, T. Ragoczy, A. Telling, et al., Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome, *Science* 326 (2009) 289–293, <https://doi.org/10.1126/science.1181369>.
- [36] F. Natale, A. Rapp, W. Yu, A. Maiser, H. Harz, A. Scholl, et al., Identification of the elementary structural units of the DNA damage response, *Nat. Commun.* 8 (2017) 15760, <https://doi.org/10.1038/ncomms15760>.
- [37] C.-S. Lee, K. Lee, G. Legube, J.E. Haber, Dynamics of yeast histone H2A and H2B phosphorylation in response to a double-strand break, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014) 103–109, <https://doi.org/10.1038/nsmb.2737>.
- [38] H. Muller, V.F. Scolari, N. Agier, A. Piazza, A. Thierry, G. Mercy, et al., Characterizing meiotic chromosomes' structure and pairing using a designer sequence optimized for Hi-C, *Mol. Syst. Biol.* 14 (2018), e8293. <https://doi.org/10.15252/msb.20188293>.
- [39] J. Dekker, K. Rippe, M. Dekker, N. Kleckner, Capturing chromosome conformation, *Science* 295 (2002) 1306–1311, <https://doi.org/10.1126/science.1067799>.
- [40] L. Patel, R. Kang, S.C. Rosenberg, Y. Qiu, R. Raviram, S. Chee, et al., Dynamic reorganization of the genome shapes the recombination landscape in meiotic prophase, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26 (2019) 164–174, <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0187-0>.
- [41] S.A. Schalbeter, G. Fudenberg, J. Baxter, K.S. Pollard, M. J. Neale, Principles of meiotic chromosome assembly, *BioRxiv* (2018)<https://doi.org/10.1101/442038>.
- [42] Y. Wang, H. Wang, Y. Zhang, Z. Du, W. Si, S. Fan, et al., Reprogramming of meiotic chromatin architecture during spermatogenesis, *Mol. Cell* 73 (2019) 547–561.e6, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.019>.

- [43] K.G. Alavattam, S. Maezawa, A. Sakashita, H. Khoury, A. Barski, N. Kaplan, et al., Attenuated chromatin compartmentalization in meiosis and its maturation in sperm development, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26 (2019) 175–184, <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0189-y>.
- [44] J.P. Lao, N. Hunter, Trying to avoid your sister, *PLoS Biol.* 8 (2010), e1000519. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000519>.
- [45] V. Borde, B. de Massy, Meiosis: early DNA double-strand breaks pave the way for inter-homolog repair, *Dev. Cell* 32 (2015) 663–664, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.011>.
- [46] Y. Blat, R.U. Protacio, N. Hunter, N. Kleckner, Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasma formation, *Cell* 111 (2002) 791–802, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01167-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01167-4).
- [47] K.P. Kim, B.M. Weiner, L. Zhang, A. Jordan, J. Dekker, N. Kleckner, Sister cohesion and structural axis components mediate homolog bias of meiotic recombination, *Cell* 143 (2010) 924–937, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.015>.
- [48] V. Sommermeyer, C. Béneut, E. Chaplais, M.E. Serrentino, V. Borde, Spp1, a member of the Set1 complex, promotes meiotic DSB formation in promoters by tethering histone H3K4 methylation sites to chromosome axes, *Mol. Cell* 49 (2013) 43–54, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.008>.
- [49] S. Panizza, M.A. Mendoza, M. Berlinger, L. Huang, A. Nicolas, K. Shirahige, et al., Spo11-accessory proteins link double-strand break sites to the chromosome axis in early meiotic recombination, *Cell* 146 (2011) 372–383, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.003>.
- [50] L. Vian, A. Pęzkowska, S.S.P. Rao, K.-R. Kieffer-Kwon, S. Jung, L. Baranello, et al., The energetics and physiological impact of cohesin extrusion, *Cell* 173 (2018) 1165–1178. e20, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.072>.
- [51] P.P. Rocha, R. Raviram, Y. Fu, J. Kim, V.M. Luo, A. Aljoufi, et al., A damage-independent role for 53BP1 that impacts break order and Igh architecture during class switch recombination, *Cell Rep.* 16 (2016) 48–55, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.073>.
- [52] E.L. Aiden, R. Casellas, Somatic rearrangement in B cells: it's (mostly) nuclear physics, *Cell* 162 (2015) 708–711, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.034>.
- [53] C. Guo, H.S. Yoon, A. Franklin, S. Jain, A. Ebert, H.-L. Cheng, et al., CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination, *Nature* 477 (2011) 424–430, <https://doi.org/10.1038/nature10495>.
- [54] S. Jain, Z. Ba, Y. Zhang, H.-Q. Dai, F.W. Alt, CTCF-binding elements mediate accessibility of RAG substrates during chromatin scanning, *Cell* 174 (2018) 102–116.e14, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.035>.
- [55] E.M. Barajas-Mora, E. Kleiman, J. Xu, N.C. Carrico, H. Lu, E.M. Oltz, et al., A B-cell-specific enhancer orchestrates nuclear architecture to generate a diverse antigen receptor repertoire, *Mol. Cell* 73 (2019) 48–60.e5, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.013>.
- [56] S. Herbert, A. Brion, J.-M. Arbona, M. Lelek, A. Veillet, B. Lelandais, et al., Chromatin stiffening underlies enhanced locus mobility after DNA damage in budding yeast, *EMBO J.* 36 (2017) 2595–2608, <https://doi.org/10.15252/embj.201695842>.
- [57] C. Zimmer, E. Fabre, Chromatin mobility upon DNA damage: state of the art and remaining questions, *Curr. Genet.* 65 (2019) 1–9, <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0852-6>.
- [58] M.S. Luijsterburg, I. de Krijger, W.W. Wiegant, R.G. Shah, G. Smeenk, A.J.L. de Groot, et al., PARP1 links CHD2-mediated chromatin expansion and H3.3 deposition to DNA repair by non-homologous end-joining, *Mol. Cell* 61 (2016) 547–562, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.019>.
- [59] H. Sellou, T. Lebeaupin, C. Chapuis, R. Smith, A. Hegele, H.R. Singh, et al., The poly(ADP-ribose)-dependent chromatin remodeler Alc1 induces local chromatin relaxation upon DNA damage, *Mol. Biol. Cell* 27 (2016) 3791–3799, <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0269>.
- [60] R.C. Burgess, B. Burman, M.J. Kruhlak, T. Misteli, Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin, *Cell Rep.* 9 (2014) 1703–1717, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.060>.
- [61] M.J. Kruhlak, A. Celeste, G. Dellaire, O. Fernandez-Capetillo, W.G. Müller, J.G. McNally, et al., Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks, *J. Cell Biol.* 172 (2006) 823–834, <https://doi.org/10.1083/jcb.200510015>.
- [62] G. Dellaire, R. Kepkay, D.P. Bazett-Jones, High resolution imaging of changes in the structure and spatial organization of chromatin, gamma-H2A.X and the MRN complex within etoposide-induced DNA repair foci, *Cell Cycle* 8 (2009) 3750–3769, <https://doi.org/10.4161/cc.8.22.10065>.
- [63] P. Oza, S.L. Jaspersen, A. Miele, J. Dekker, C.L. Peterson, Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery, *Genes Dev.* 23 (2009) 912–927, <https://doi.org/10.1101/gad.1782209>.
- [64] S. Nagai, K. Dubrana, M. Tsai-Pflugfelder, M.B. Davidson, T.M. Roberts, G.W. Brown, et al., Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase, *Science* 322 (2008) 597–602, <https://doi.org/10.1126/science.1162790>.
- [65] F. Aymard, M. Aguirrebengoa, E. Guillou, B.M. Javierre, B. Bugler, C. Arnould, et al., Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24 (2017) 353–361, <https://doi.org/10.1038/nsmb.3387>.
- [66] T. Clouaire, A. Marnef, G. Legube, Taming tricky DSBs: ATM on duty, *DNA Repair (Amst)* 56 (2017) 84–91, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.010>.
- [67] M.J. Smith, R. Rothstein, Poetry in motion: increased chromosomal mobility after DNA damage, *DNA Repair (Amst)* 56 (2017) 102–108, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.012>.
- [68] V. Garcia, S. Gray, R.M. Allison, T.J. Cooper, M.J. Neale, Tel1(ATM)-mediated interference suppresses clustered meiotic double-strand-break formation, *Nature* 520 (2015) 114–118, <https://doi.org/10.1038/nature13993>.
- [69] T.J. Cooper, V. Garcia, M.J. Neale, Meiotic DSB patterning: a multifaceted process, *Cell Cycle* 15 (2016) 13–21, <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1093709>.
- [70] P.R. Potts, M.H. Porteus, H. Yu, Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks, *EMBO J.* 25 (2006) 3377–3388, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601218>.
- [71] E. Unal, A. Arbel-Eden, U. Sattler, R. Shroff, M. Lichten, J.E. Haber, et al., DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain, *Mol. Cell* 16 (2004) 991–1002, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.027>.
- [72] L. Ström, H.B. Lindroos, K. Shirahige, C. Sjögren, Post-replicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is

- required for DNA repair, *Mol. Cell* 16 (2004) 1003–1015, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.026>.
- [73] C. Bot, A. Pfeiffer, F. Giordano, D.E. Manjeera, N.P. Dantuma, L. Ström, Independent mechanisms recruit the cohesin loader protein NIPBL to sites of DNA damage, *J. Cell Sci.* 130 (2017) 1134–1146, <https://doi.org/10.1242/jcs.197236>.
- [74] Meisenberg C, Pinder SI, Hopkins SR, Wooller SK, Benstead-Hume G, Pearl FMG, et al. Repression of transcription at DNA breaks requires cohesin throughout interphase and prevents genome instability. *Mol Cell* 2019; 73:212–223.e7. doi:10.1016/j.molcel.2018.11.001.
- [75] L. Ström, C. Carlsson, H.B. Lindroos, S. Wedahl, Y. Katou, K. Shirahige, et al., Postreplicative formation of cohesin is required for repair and induced by a single DNA break, *Science* 317 (2007) 242–245, <https://doi.org/10.1126/science.1140649>.
- [76] S.-T. Kim, B. Xu, M.B. Kastan, Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage, *Genes Dev.* 16 (2002) 560–570, <https://doi.org/10.1101/gad.970602>.
- [77] N. Wu, X. Kong, Z. Ji, W. Zeng, P.R. Potts, K. Yokomori, et al., Scc1 sumoylation by Mms21 promotes sister chromatid recombination through counteracting Wapl, *Genes Dev.* 26 (2012) 1473–1485, <https://doi.org/10.1101/gad.193615.112>.
- [78] Hellmuth S, Gutiérrez-Caballero C, Llano E, Pendás AM, Stemann O. Local activation of mammalian separase in interphase promotes double-strand break repair and prevents oncogenic transformation. *EMBO J* 2018;37. doi: 10.15252/embj.201899184.
- [79] Y. Oka, K. Suzuki, M. Yamauchi, N. Mitsutake, S. Yamashita, Recruitment of the cohesin loading factor NIPBL to DNA double-strand breaks depends on MDC1, RNF168 and HP1 γ in human cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411 (2011) 762–767, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.021>.
- [80] J. Lightfoot, S. Testori, C. Barroso, E. Martinez-Perez, Loading of meiotic cohesin by SCC-2 is required for early processing of DSBs and for the DNA damage checkpoint, *Curr. Biol.* 21 (2011) 1421–1430, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.007>.
- [81] X. Kong, A.R. Ball, H.X. Pham, W. Zeng, H.-Y. Chen, J.A. Schmiesing, et al., Distinct functions of human cohesin-SA1 and cohesin-SA2 in double-strand break repair, *Mol. Cell Biol.* 34 (2014) 685–698, <https://doi.org/10.1128/MCB.01503-13>.
- [82] P.T. Yazdi, Y. Wang, S. Zhao, N. Patel, E.Y.-H.P. Lee, J. Qin, SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint, *Genes Dev.* 16 (2002) 571–582, <https://doi.org/10.1101/gad.970702>.
- [83] E. Unal, J.M. Heidinger-Pauli, D. Koshland, DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7), *Science* 317 (2007) 245–248, <https://doi.org/10.1126/science.1140637>.
- [84] A. McAleenan, V. Cordon-Preciado, A. Clemente-Blanco, I.-C. Liu, N. Sen, J. Leonard, et al., SUMOylation of the α -kleisin subunit of cohesin is required for DNA damage-induced cohesion, *Curr. Biol.* 22 (2012) 1564–1575, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.045>.
- [85] J.M. Heidinger-Pauli, E. Unal, D. Koshland, Distinct targets of the Eco1 acetyltransferase modulate cohesion in S phase and in response to DNA damage, *Mol. Cell* 34 (2009) 311–321, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.008>.
- [86] N. Takahashi, M. Quimbaya, V. Schubert, T. Lammens, K. Vandepoele, I. Schubert, et al., The MCM-binding protein ETG1 aids sister chromatid cohesion required for post-replicative homologous recombination repair, *PLoS Genet.* 6 (2010), e1000817. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000817>.
- [87] C. Bauerschmidt, C. Arrichiello, S. Burdak-Rothkamm, M. Woodcock, M.A. Hill, D.L. Stevens, et al., Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 477–487, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp976>.
- [88] S. Covo, J.W. Westmoreland, D.A. Gordenin, M.A. Resnick, Cohesin is limiting for the suppression of DNA damage-induced recombination between homologous chromosomes, *PLoS Genet.* 6 (2010), e1001006. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001006>.
- [89] C. Sjögren, K. Nasmyth, Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Biol.* 11 (2001) 991–995, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00271-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00271-8).
- [90] H. Dodson, C.G. Morrison, Increased sister chromatid cohesion and DNA damage response factor localization at an enzyme-induced DNA double-strand break in vertebrate cells, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 6054–6063, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp684>.
- [91] C. Gelot, J. Guirouilh-Barbat, B.S. Lopez, The cohesin complex prevents the end-joining of distant DNA double-strand ends in S phase: consequences on genome stability maintenance, *Nucleus* 7 (2016) 339–345, <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1194159>.
- [92] F. Lang, X. Li, W. Zheng, Z. Li, D. Lu, G. Chen, et al., CTCF prevents genomic instability by promoting homologous recombination-directed DNA double-strand break repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 10912–10917, <https://doi.org/10.1073/pnas.1704076114>.
- [93] K. Hilmi, M. Jangal, M. Marques, T. Zhao, A. Saad, C. Zhang, et al., CTCF facilitates DNA double-strand break repair by enhancing homologous recombination repair, *Sci. Adv.* 3 (2017), e1601898. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1601898>.
- [94] D. Han, Q. Chen, J. Shi, F. Zhang, X. Yu, CTCF participates in DNA damage response via poly(ADP-ribosylation), *Sci. Rep.* 7 (2017) 43530, <https://doi.org/10.1038/srep43530>.
- [95] Clouaire T, Rocher V, Lashgari A, Arnould C, Aguirrebengoa M, Biernacka A, et al. Comprehensive mapping of histone modifications at DNA double-strand breaks deciphers repair pathway chromatin signatures. *Mol Cell* 2018; 72:250–262.e6. doi:10.1016/j.molcel.2018.08.020.
- [96] S. Feldman, R. Wuerffel, I. Achour, L. Wang, P.B. Carpenter, A.L. Kenter, 53BP1 contributes to Igh locus chromatin topology during class switch recombination, *J. Immunol.* 198 (2017) 2434–2444, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601947>.
- [97] J.R. Chapman, P. Barral, J.-B. Vannier, V. Borel, M. Steger, A. Tomas-Loba, et al., RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection, *Mol. Cell* 49 (2013) 858–871, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.002>.
- [98] M. Di Virgilio, E. Callen, A. Yamane, W. Zhang, M. Jankovic, A.D. Gitlin, et al., Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching, *Science* 339 (2013) 711–715, <https://doi.org/10.1126/science.1230624>.
- [99] M. Zimmermann, F. Lotterberger, S.B. Buonomo, A. Sfeir, T. de Lange, 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to

- control 5' end resection, *Science* 339 (2013) 700–704, <https://doi.org/10.1126/science.1231573>.
- [100] R. Foti, S. Gnan, D. Cornacchia, V. Dileep, A. Bulut-Karslioglu, S. Diehl, et al., Nuclear architecture organized by Rif1 underpins the replication-timing program, *Mol. Cell* 61 (2016) 260–273, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.001>.
- [101] J.P. Manis, J.C. Morales, Z. Xia, J.L. Kutok, F.W. Alt, P.B. Carpenter, 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 481–487, <https://doi.org/10.1038/ni1067>.
- [102] A. Bothmer, D.F. Robbiani, M. Di Virgilio, S.F. Bunting, I.A. Klein, N. Feldhahn, et al., Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1, *Mol. Cell* 42 (2011) 319–329, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.03.019>.
- [103] T. Ryu, B. Spatola, L. Delabaere, K. Bowlin, H. Hopp, R. Kunitake, et al., Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair, *Nat. Cell Biol.* 17 (2015) 1401–1411, <https://doi.org/10.1038/ncb3258>.
- [104] C. Horigome, E. Unozawa, T. Ooki, T. Kobayashi, Ribosomal RNA gene repeats associate with the nuclear pore complex for maintenance after DNA damage, *PLoS Genet.* 15 (2019), e1008103. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008103>.
- [105] K. Tsouroula, A. Furst, M. Rogier, V. Heyer, A. Maglott-Roth, A. Ferrand, et al., Temporal and spatial uncoupling of DNA double strand break repair pathways within mammalian heterochromatin, *Mol. Cell* 63 (2016) 293–305, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.002>.
- [106] M. van Sluis, B. McStay, A localized nucleolar DNA damage response facilitates recruitment of the homology-directed repair machinery independent of cell cycle stage, *Genes Dev.* 29 (2015) 1151–1163, <https://doi.org/10.1101/gad.260703.115>.
- [107] S.M. Harding, J.A. Boiarsky, R.A. Greenberg, ATM dependent silencing links nucleolar chromatin reorganization to DNA damage recognition, *Cell Rep.* 13 (2015) 251–259, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.085>.
- [108] J.A. Aten, J. Stap, P.M. Krawczyk, C.H. van Oven, R.A. Hoebe, J. Essers, et al., Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains, *Science* 303 (2004) 92–95, <https://doi.org/10.1126/science.1088845>.
- [109] P.M. Krawczyk, J. Stap, C. van Oven, R. Hoebe, J.A. Aten, Clustering of double strand break-containing chromosome domains is not inhibited by inactivation of major repair proteins, *Radiat. Prot. Dosim.* 122 (2006) 150–153, <https://doi.org/10.1093/rpd/ncl479>.
- [110] T. Neumaier, J. Swenson, C. Pham, A. Polyzos, A.T. Lo, P. Yang, et al., Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 443–448, <https://doi.org/10.1073/pnas.1117849108>.
- [111] N.W. Cho, R.L. Dille, M.A. Lampson, R.A. Greenberg, Interchromosomal homology searches drive directional ALT telomere movement and synapsis, *Cell* 159 (2014) 108–121, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.030>.
- [112] P. Caron, J. Choudjaye, T. Clouaire, B. Bugler, V. Daburon, M. Aguirrebengoa, et al., Non-redundant functions of ATM and DNA-PKcs in response to dna double-strand breaks, *Cell Rep.* 13 (2015) 1598–1609, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.024>.
- [113] P.M. Krawczyk, T. Borovski, J. Stap, T. Cijssouw, R. ten Cate, J.P. Medema, et al., Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 2127–2133, <https://doi.org/10.1242/jcs.089847>.
- [114] B.R. Schrank, T. Aparicio, Y. Li, W. Chang, B.T. Chait, G.G. Gundersen, et al., Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair, *Nature* 559 (2018) 61–66, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0237-5>.
- [115] D.P. Waterman, F. Zhou, K. Li, C.-S. Lee, M. Tsabar, V.V. Eapen, et al., Live cell monitoring of double strand breaks in *S. cerevisiae*, *PLoS Genet* 15 (2019), e1008001. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008001>.
- [116] A. Guénolé, G. Legube, A meeting at risk: unrepaired DSBs go for broke, *Nucleus* 8 (2017) 589–599, <https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1380138>.
- [117] V. Hurst, K. Shimada, S.M. Gasser, Nuclear actin and actin-binding proteins in DNA repair, *Trends Cell Biol.* 29 (2019) 462–476, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.02.010>.
- [118] V.N. Evdokimova, M. Gandhi, A.V. Nikitski, C.J. Bakkenist, Y.E. Nikiforov, Nuclear myosin/actin-motored contact between homologous chromosomes is initiated by ATM kinase and homology-directed repair proteins at double-strand DNA breaks to suppress chromosome rearrangements, *Oncotarget* 9 (2018) 13612–13622, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24434>.
- [119] C.P. Caridi, C. D'Agostino, T. Ryu, G. Zapotoczny, L. Delabaere, X. Li, et al., Nuclear F-actin and myosin drive relocalization of heterochromatic breaks, *Nature* 559 (2018) 54–60, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0242-8>.
- [120] B.J. Belin, T. Lee, R.D. Mullins, DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin-2 and Spire-1/2 that promotes efficient DNA repair [corrected], *Elife* 4 (2015), e07735. <https://doi.org/10.7554/eLife.07735>.
- [121] F. Lottersberger, R.A. Karssemeijer, N. Dimitrova, T. de Lange, 53BP1 and the LINC complex promote microtubule-dependent DSB mobility and DNA repair, *Cell* 163 (2015) 880–893, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.057>.
- [122] J. Lawrimore, T.M. Barry, R.M. Barry, A.C. York, B. Friedman, D.M. Cook, et al., Microtubule dynamics drive enhanced chromatin motion and mobilize telomeres in response to DNA damage, *Mol. Biol. Cell* 28 (2017) 1701–1711, <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-12-0846>.
- [123] A. Amitai, A. Seeber, S.M. Gasser, D. Holcman, Visualization of chromatin decompaction and break site extrusion as predicted by statistical polymer modeling of single-locus trajectories, *Cell Rep.* 18 (2017) 1200–1214, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.018>.
- [124] R. Oshidari, J. Strecker, D.K.C. Chung, K.J. Abraham, J.N. Y. Chan, C.J. Damaren, et al., Nuclear microtubule filaments mediate non-linear directional motion of chromatin and promote DNA repair, *Nat. Commun.* 9 (2018) 2567, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05009-7>.
- [125] A.G. Larson, D. Elnatan, M.M. Keenen, M.J. Trnka, J.B. Johnston, A.L. Burlingame, et al., Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin, *Nature* 547 (2017) 236–240, <https://doi.org/10.1038/nature22822>.
- [126] A.R. Strom, A.V. Emelyanov, M. Mir, D.V. Fyodorov, X. Darzacq, G.H. Karpen, Phase separation drives heterochromatin domain formation, *Nature* 547 (2017) 241–245, <https://doi.org/10.1038/nature22989>.
- [127] C. Baldeyron, G. Soria, D. Roche, A.J.L. Cook, G. Almouzni, HP1 α recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair, *J. Cell Biol.* 193 (2011) 81–95, <https://doi.org/10.1083/jcb.201101030>.
- [128] Y.-H. Lee, C.-Y. Kuo, J.M. Stark, H.-M. Shih, D.K. Ann, HP1 promotes tumor suppressor BRCA1 functions during the

- DNA damage response, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 5784–5798, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt231>.
- [129] W. Wu, H. Nishikawa, T. Fukuda, V. Vittal, M. Asano, Y. Miyoshi, et al., Interaction of BARD1 and HP1 is required for BRCA1 retention at sites of DNA damage, *Cancer Res.* 75 (2015) 1311–1321, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2796>.
- [130] M. Alagoz, Y. Katsuki, H. Ogiwara, T. Ogi, A. Shibata, A. Kakarougkas, et al., SETDB1, HP1 and SUV39 promote repositioning of 53BP1 to extend resection during homologous recombination in G2 cells, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 7931–7944, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv722>.
- [131] M.S. Luijsterburg, C. Dinant, H. Lans, J. Stap, E. Wiemasz, S. Lagerwerf, et al., Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage, *J. Cell Biol.* 185 (2009) 577–586, <https://doi.org/10.1083/jcb.200810035>.
- [132] M.K. Ayrappetov, O. Gursoy-Yuzugullu, C. Xu, Y. Xu, B.D. Price, DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 9169–9174, <https://doi.org/10.1073/pnas.1403565111>.
- [133] M. Altmeyer, K.J. Neelsen, F. Teloni, I. Pozdnyakova, S. Pellegrino, M. Grøfte, et al., Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose), *Nat. Commun.* 6 (2015) 8088, <https://doi.org/10.1038/ncomms9088>.
- [134] Singatulina AS, Hamon L, Sukhanova MV, Desforges B, Joshi V, Bouhss A, et al. PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARG-reversible compartments enriched in damaged DNA. *Cell Rep* 2019;27:1809–1821. e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.04.031.
- [135] Kilic S, Lezaja A, Gatti M, Bianco E, Michelena J, Imhof R, et al. Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments. *EMBO J* 2019; e101379. doi:10.15252/embj.2018101379.
- [136] Y. Zhang, R.P. McCord, Y.-J. Ho, B.R. Lajoie, D.G. Hildebrand, A.C. Simon, et al., Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations, *Cell* 148 (2012) 908–921, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.002>.
- [137] H.J. Gothe, V. Minneker, V. Roukos, Dynamics of double-strand breaks: implications for the formation of chromosome translocations, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1044 (2018) 27–38, https://doi.org/10.1007/978-981-13-0593-1_3.



Analyzing Homologous Recombination at a Genome-Wide Level

Coline Arnould, Vincent Rocher, and Gaëlle Legube

Abstract

Among the types of damage, DNA double-strand breaks (DSBs) (provoked by various environmental stresses, but also during normal cell metabolic activity) are the most deleterious, as illustrated by the variety of human diseases associated with DSB repair defects. DSBs are repaired by two groups of pathways: homologous recombination (HR) and nonhomologous end joining. These pathways do not trigger the same mutational signatures, and multiple factors, such as cell cycle stage, the complexity of the lesion and also the genomic location, contribute to the choice between these repair pathways. To study the usage of the HR machinery at DSBs, we propose a genome-wide method based on the chromatin immunoprecipitation of the HR core component Rad51, followed by high-throughput sequencing.

Key words Homologous recombination, DNA double-strand break, DNA repair, Chromatin immunoprecipitation, ChIP-seq, Next generation sequencing

1 Introduction

DNA double-strand breaks (DSBs) are highly toxic lesions that arise on the genome following exposure to environmental stresses (radiation, chemotherapies) or during specific developmental processes (at immunoglobulin loci or on meiotic chromosomes). Yet, it is now clear that they also occur accidentally on a more regular basis than previously thought, due to normal metabolic activities such as the release of topological constraints or during replication (reviewed [1–3]).

DSBs can be repaired by homologous recombination (HR) or nonhomologous end joining (NHEJ) [4]. While homologous recombination prevails during S/G2, it does not handle all DSBs across the genome, and the repair pathway choice strongly depends on the genomic location and the surrounding chromatin context where a DSB occurs (reviewed in [1, 5, 6]). HR and NHEJ involve different set of proteins giving the opportunity to analyze HR usage by assessing the recruitment of specific HR components. For

example, immunostaining against the Rad51 recombinase is widely used to investigate how various factors influence the repair pathway choice. While allowing analyses at a single cell level, imaging, however, does not provide the exact information about the genomic position of each DSB, which prevents from drawing conclusions about the role of the surrounding chromatin context into the decision to undergo HR and to generalize findings to DSBs induced in all types of loci. In contrast, chromatin immunoprecipitation (ChIP) allows to assess at a high resolution the recruitment of a given protein at a given locus, on average in the cell population. When combined with high-throughput sequencing (ChIP-seq), it provides a unique and convenient way to analyze at a genome-wide scale and simultaneously the tendency of various loci to undergo HR when broken. Accordingly, HR usage can be analyzed in a genome-wide manner by performing ChIP-seq against Rad51 [7]. Of importance, it is necessary to assess in parallel the extent of recruitment of the NHEJ pathway or directly the extent of DSB production in the cell population in order to “normalize” the recruitment of Rad51 at each locus. This can be achieved by either NHEJ ChIP-seq (XRCC4 or LigIV) [7, 8] or by the recently implemented BLESS [8, 9], BLISS [10], i-BLESS [11], DSBCapture [12], or END-seq [13] techniques.

Here we present our method to perform the genome-wide mapping of Rad51 by ChIP-seq in the DlvA cell system [14], where multiples DSB can be induced in a controlled manner by the AsiSI restriction enzyme. Importantly this method can also be implemented using either alternative ways to induce annotated DSBs (I-PpoI, CRISPR/Cas9) or using chemical agents that produce DSB in a non-random manner across the genome (such as etoposide for instance [15, 16]).

2 Materials

Prepare all buffers the day of use and filter all buffers with 0.2 µm filter. Use filter tips and siliconized (or DNA low bind) tubes throughout the procedure. Use DNase- and RNase-free water (molecular grade) at all steps.

2.1 Material

1. Sigma 4-Hydroxy Tamoxifen H7904-5MG (if using DlvA cells).
2. Sigma Formaldehyde solution 37% F8775-500 mL.
3. ThermoFisher Pierce™ Protein A Agarose 11846754.
4. Sigma Protein G sepharose P3296-5ML.
5. Roche Complete Mini EDTA free 11836170001.
6. Roche Complete EDTA free 11873580001.
7. BSA (Bovine Serum Albumin solution) Sigma B8667-5 mL.

8. DNase-free Ribonuclease A Sigma R4642.
9. Proteinase K recombinant, PCR Grade (Roche) Sigma 3115828001.
10. Fisher Invitrogen UltraPurePhenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 11518756.
11. Sigma Chloroform—isoamylalcohol 25666.
12. Invitrogen™ UltraPure™ Glycogen Fisher Scientific 10757844.
13. Rad51 antibody Santacruz sc8349 or Abcam #ab176458.
14. XRCC4 antibody Atlas antibodies HPA006801 or Abcam #ab145.
15. SYBR qPCRpremix Ex TaqOzyme TAKRR420W.

2.2 Buffers

1. Cellular Lysis Buffer: Pipes 5 mM pH 8, NP-40 0.5%, KCl 85 mM. Add 200 μ L Pipes 0.5 M pH 8, 850 μ L KCl 2 M, 1 mL NP-40 10%, and make up to 20 mL with DNase- and RNase-free water. Add two tablets of protease inhibitor “complete mini EDTA free”. Once dissolved, filter the buffer using a 0.2 μ M filter.
2. Nuclear Lysis Buffer: Tris–HCl pH 8.1 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%. Add 1 mL of Tris–HCl 1 M pH 8.1, 400 μ L EDTA 0.5 M pH 8, 2 mL SDS 10%, and make up to 20 mL with DNase- and RNase-free water. Add two tablets of protease inhibitor “complete mini EDTA free”. Once dissolved, filter the buffer using a 0.2 μ M filter.
3. Dilution Buffer: SDS 0.01%, Triton X100 1.11%, EDTA pH 8 1.2 mM, Tris–HCl pH 8.1 16.7 mM, NaCl 167 mM. Add 50 μ L SDS 10%, 5.5 mL Triton X100 10%, 120 μ L EDTA 0.5 M pH 8, 835 μ L Tris–HCl 1 M pH 8.1, 1670 μ L NaCl 5 M, and make up to 50 mL using DNase- and RNase-free water. Add one tablet protease inhibitor “complete EDTA free”. Once dissolved, filter the buffer using a 0.2 μ M filter.
4. IP buffer: SDS 0.1%, Triton 1%, EDTA 2 mM, Tris–HCl pH 8.1 20 mM, NaCl 150 mM. 1 V of Nuclear Lysis Buffer/9 V of Dilution buffer.
5. Dialysis Buffer: EDTA 2 mM, Tris–HCl pH 8.1 50 mM, Sarkosyl 0.2%. Add 80 μ L EDTA 0.5 M, 1 mL Tris–HCl 1 M pH 8.1, 200 μ L Sarkosyl 20%, and make up to 20 mL using DNase- and RNase-free water. Add two tablets protease inhibitor “complete mini EDTA free”. Once dissolved, filter the buffer using a 0.2 μ M filter.
6. Wash Buffer: Tris–HCl 100 mM pH 8.8, LiCl 0.5 M, NP-40 1%, NaDoc 1%. Add 1.66 mL Tris 3 M pH 8.8, 5 mL LiCl 5 M, 5 mL NP-40 10%, 5 mL NaDoc 10%, and make up 50 mL with

DNase- and RNase-free water. Add one tablet protease inhibitor “complete EDTA free”. Once dissolved, filter the buffer using a 0.2 μ M filter.

7. TE Buffer: Tris–HCl 10 mM pH 8.1, EDTA 1 mM pH 8. Add 500 μ L Tris–HCl 1 M pH 8.1, 100 μ L EDTA 0.5 M, and make up to 50 mL using DNase- and RNase-free water. Filter TE using a 0.2 μ M filter.

3 Methods

3.1 Cell Treatment and Fixation

1. Seed 5×10^6 DIIvA cells in 140 mm dishes the day before treatment (one dish per point of ChIP).
2. Treat DIIvA cells or not for 4 h with 300 nM 4-hydroxy tamoxifen to induce DSBs.
3. Fix cells directly in the dishes with a final formaldehyde concentration of 1% during 15 min at room temperature under rocking (*see Note 1*). Quench the reaction by adding Glycine at a final concentration of 0.125 M and wait 5 min on the rocking platform.
4. Wash twice with $1 \times$ PBS and collect cells by scrapping. Centrifuge cells 5 min at $500 \times g$, remove the PBS, and freeze the pellets at -20°C (or -80°C for long-term storage).

3.2 A/G Beads Preparation

For each point of chromatin immunoprecipitation (each antibody), prepare a total of 200 μ L of a mixture of A/G beads (diluted at 50%) to perform with the same beads preparation both the pre-clearing step (100 μ L) and the immunoprecipitation step (100 μ L). The following quantities are for 200 μ L (i.e., per point of ChIP). Upgrade quantities depending on the number of ChIPs planned.

1. Wash beads twice in IP buffer. Centrifuge 2 min at $500 \times g$ between each wash step.
2. Resuspend beads in the same volume of IP buffer.
3. Beads saturation: Add 5 μ L of BSA 20 mg/mL and incubate 3–4 h at 4°C under rocking.
4. Wash beads twice in IP buffer and resuspend beads in the same volume of IP buffer. Saturated A/G beads can be stored for short term at 4°C (few days).

3.3 Chromatin Preparation

1. Plan one cell pellet (5×10^6 cells) per point of ChIP (hence here, use at least three pellets in total for Rad51, XRCC4 and a mock ChIP, in each condition assessed). The following quantities are for one pellet, upgrade according to the number of cell pellets. Perform the experiment on a least three pellets (15×10^6 cells in total) to perform sonication in no less than 1.5 mL final volume.

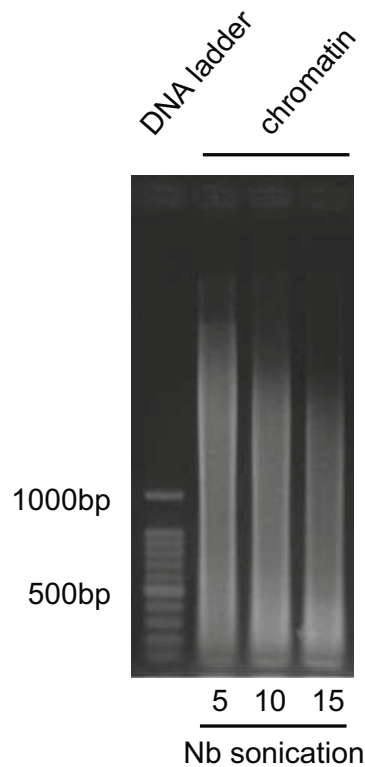


Fig. 1 Chromatin fragmentation. Electrophoretic gel to check the sonication efficiency, following 5, 10, or 15 times of sonication (10 s each: % duty cycle = 50; output = 5). A large smear with a bulk between 200 bp and 2 kb is observed

2. Resuspend each pellet in the cellular lysis buffer (1 mL for 5×10^6 cells) and incubate 10 min on ice.
3. Pool the lysate from same conditions (i.e., if starting with three cell pellets, the final volume shall be 3 mL). Homogenize with a dounce and the B pestle 20 times, keep on ice for 2 min, and repeat the procedure once again (20 times).
4. Collect in a new 15 mL tube and pellet nuclei by centrifuging 5 min at $3400 \times g$, at 4°C .
5. Resuspend the nuclei pellet in nuclear lysis buffer (500 μL for 5×10^6 cells, i.e., for three pellets 1.5 mL) and wait 10 min on ice.
6. Sonicate according to your manufacturer instructions to obtain an average fragments size between 500 bp and 1 kb (Fig. 1 and *see Note 2*).
7. Dose DNA using a NanodropTM (the nuclear lysis buffer should be used as blank). Use 200 μg of chromatin per point of ChIP for the following steps (should correspond to approximately 500 μL of the chromatin preparation, i.e., 5×10^6 cells).
8. Dilute ten times the sonicated chromatin with the Dilution buffer (9 vol for 1 vol of sonicated chromatin). Use IP buffer

to adjust all chromatin samples to the same concentration and final volume.

9. Add 100 μL of 50% A/G beads previously prepared per 200 μg of chromatin (i.e., per approx. 5×10^6 cells, so for three cell pellets, 300 μL of diluted A/G beads) and incubate 1–2 h at 4 $^{\circ}\text{C}$ on a wheel to preclear the chromatin.
10. Centrifuge 10 min at $3400 \times g$ at 4 $^{\circ}\text{C}$ and carefully transfer the supernatant in a new 15 mL Falcon tube. Make sure to not carry over any beads, as this would carry over large amount of sticky DNA translating in a high background level in the ChIP experiment (*see Note 3*).
11. Take 100 μL of each condition for inputs that are further stored at -20°C .

3.4 Chromatin Immunoprecipitation

1. Use 200 μg of precleared chromatin per immunoprecipitation. Further add either 3 μg of Rad51 antibody (Santacruz sc8349) (*see Note 4*), 2 μg of the XRCC4 antibody (Atlas antibodies HPA006801) (*see Note 5*), or no antibody (for the “Mock” immunoprecipitation, a Rabbit Anti-rat IgG (R9255 Sigma) can also be used here).
2. Incubate overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$ on a wheel.
3. Add A/G beads: 100 μL of your previously prepared beads per IP and incubate for 2 h at 4 $^{\circ}\text{C}$ on a wheel.
4. Centrifuge 2 min at $800 \times g$.
5. Wash beads once in 1 mL of Dialysis buffer. Transfer in a DNA low bind Eppendorf tube.
6. Wash beads five times in Wash Buffer. Incubate 5–10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ on the wheel, followed by gentle ($500 \times g$) 2 min of centrifugation, for each wash step.
7. Wash twice in TE buffer and resuspend the beads in 200 μL of TE buffer. Add 100 μL of TE buffer on inputs taken out from the freezer, to have a final volume of 200 μL and follow the same subsequent steps for inputs than for IP samples.
8. Add 1 μL of RNase (10 mg/mL) and incubate 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$.
9. Add 4 μL of SDS 10% and incubate at 70 $^{\circ}\text{C}$ overnight with strong shaking to reverse the crosslink.

3.5 DNA Purification

1. Add 4 μL of proteinase K (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubate 1 h 30 at 45 $^{\circ}\text{C}$.
2. Add 200 μL of phenol/chloroform. Vortex few seconds and centrifuge 5 min max speed.

3. Take supernatant in a new DNA low bind tube. Back extract the phenol fraction with 200 μL of TE and mix the two aqueous fractions (400 μL final).
4. Perform two successive chloroform extractions.
5. Precipitate DNA of each IP and input with 2.5 volume of EtOH 100%, 0.1 volume of Sodium Acetate 3 M pH 5.5, and 1 μL of glycogen at 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
6. Keep Overnight at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
7. Centrifuge 15 min at $20,000 \times g$ and wash pellet in EtOH 70%.
8. Centrifuge again and air-dry pellets for at least 15 min.
9. Resuspend in 100 μL of H_2O DNase- and RNase-free water.

3.6 Real-Time Quantitative PCR

The efficiency of the ChIP shall be evaluated by qPCR before proceeding to deep sequencing. Primers used for the qPCR should be between 80 bp and 2 kb from the DSB site, since Rad51 is recruited in average on 2 kb surrounding the DSB (if using DIvA cells, refer to Table 1 for primers sequences). Also check enrichment on at least one negative control locus (without a DSB site, *see* Table 1).

1. Heat samples 5 min at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, vortex few seconds.
2. Every point should be in duplicate or triplicate. Fill each well of the qPCR plate as follows:
 - (a) 2 μL of ChIP sample or 2 μL of input.
 - (b) 1 μL of the forward primer from a 10- μM stock solution.
 - (c) 1 μL of the reverse primer from a 10- μM stock solution.
 - (d) 2 μL H_2O .
 - (e) 6 μL SYBR qPCRpremix Ex Taq.

Table 1
Primers for ChIP-qPCR

	Forward primer	Reverse primer
Control region	AGCACATGGGATTTTGCAGG	TTCCCTCCTTTGTGTCACCA
DSB#A (80 bp)	CCGCCAGAAAGTTTCCTAGA	CTCACCCCTTGCAGCACTTG
DSB#B (80 bp)	CCGTCCGTTACGTAGAATGC	GGGCGGGGATTATGTAATTT

qPCR primers sequences for a control region (without DSB) and for two DSB sites that display Rad51 enrichment

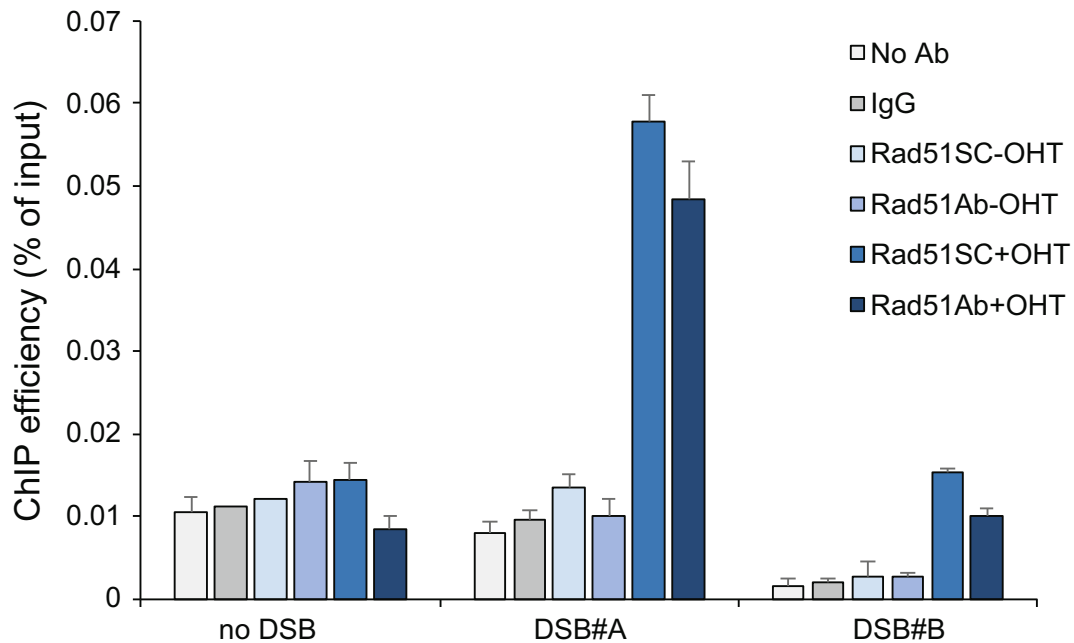


Fig. 2 Rad51 Chromatin immunoprecipitation followed by qPCR in DlvA cells. Two Rad51 antibodies (Rad51SC: sc8349 or Rad51Ab:ab176458) were used to perform ChIP-qPCR in damaged (+OHT) or undamaged (–OHT) DlvA cells (as indicated). Control ChIP was performed either with no antibody (noAb) or with the Rabbit Anti-rat IgG (R9255 Sigma) (IgG) in the –OHT condition. Enrichment was determined by qPCR at a control genomic region (no DSB) and at 80 bp to two DSBs induced by AsiSI. Results are shown as % of input immunoprecipitated

3. Run qPCR by cycling as follow:

- 95 °C 3 min.
- 40 times:
 - 95 °C 20 s.
 - 60 °C 30 s.
 - 72 °C 20 s.
 - 78 °C 15 s (Plate read).

4. Analyze your samples and express data in percentage of input immunoprecipitated (Fig. 2).

3.7 Preparation for Deep Sequencing

Approximately 5–10 ng are needed to proceed to the library, which corresponds to ~10 immunoprecipitations/condition.

1. Pool all your identical samples together. (Treat the inputs in the same way for the following steps.)
2. Sonicate sample using a Bioruptor (Diagenode) to obtain an average fragments size of 200–300 bp.
3. Concentrate your samples with a Speed-VacTM (T° : 45 °C, mode “V-AQ”) until a volume of ~15 μ L.
4. Dose 1 μ L of DNA with a Qubit[®] or a QuantusTM.

5. Run 5–10 μL of inputs on a 2% agarose gel to check the sonication efficiency. For efficient library preparation and sequencing, bulk DNA should be around 300 bp.
6. Send the samples to your sequencing facility to proceed to the library preparation and deep sequencing. Single-end sequencing is sufficient for ChIP-seq experiments. Between 20 and 50 million reads are needed per condition to obtain a good coverage.

3.8 ChIP-Seq Analysis

1. Quality Control. The sequencing quality for each of your files must be checked before doing anything else, using a quality control tool, like FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), in order to check whether the majority of your reads have a good per base sequence quality and if FastQC detects any adapters. To remove adapters, use tools like Cutadapt or Trimmomatic.
2. Alignment on a reference genome (GRCh37/hg19 or the most recent GRCh38/h38). Sequencing files in fastq format shall then be mapped with an aligner such as bwa (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) to a reference genome in single-end mode if only one end of the DNA fragment is sequenced (or in paired-end if the two ends were sequenced). The alignment file obtained is either in SAM format (text-based format) or in BAM format (Binary-based format). Use FastQC on the aligned files, to check the number of mapped reads and the number of duplicated sequences (PCR duplicates).
3. Convert in BAM format if the files are in SAM format using samtools command `samtools view -b myfile.sam -o myfile.bam`.
4. Remove the PCR duplicates using samtools command `samtools rmdup -s myfile.bam myfile.rmdup.bam`.
5. Sort and index the BAM files in order to facilitate the analysis (most post-alignment tools need an index to work) using samtools sort `-o myfile.sort.bam myfile.rmdup.bam` and samtools index `myfile.sort.bam myfile.sort.bai`.
6. Use the command samtools flagstat to parse the files and to check the alignment flags (to read more: <https://broadinstitute.github.io/picard/explain-flags.html>). If reads are not primary alignment (or supplementary alignment), this means that a sequence has been mapped several times on the genome and is therefore present in several copies in your files. In most cases, the best match should be kept.
7. Obtain the genome-wide coverage file using Deeptools command `bamCoverage -b myfile.sort.bam -o myfile.bw -of bigwig`. A lot of optional parameters are available, including coverage normalization, if you want to compare between two or more conditions.

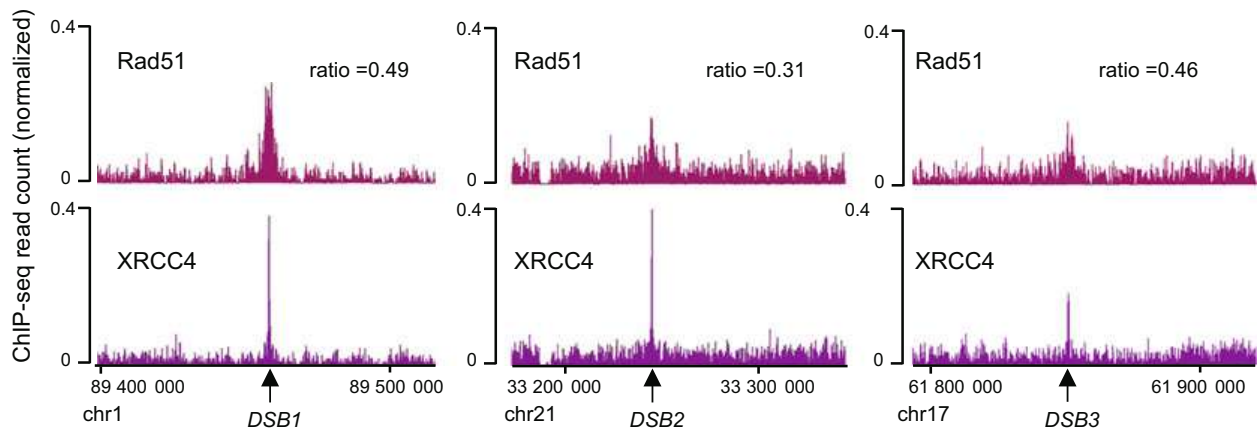


Fig. 3 Genome Browser screenshots of Rad51 and XRCC4 ChIP-seq in DlvA cells. Genome browser view of the Rad51 and XRCC4 ChIP-seq signal at three different DSBs induced by AsiSI in DlvA cells. The Ratio Rad51 on 4 kb over XRCC4 on 500 bp is indicated. On the one hand, DSB1 and DSB2 display equivalent XRCC4 binding (cleavage efficiency) but different level of Rad51, indicating that DSB1 is more prone to HR than DSB2. On the other hand, while on DSB3 the Rad51 signal is lower than on DSB1, the XRCC4 signal also reveals that DSB3 is less induced than DSB1. When normalizing against XRCC4, DSB3 display a similar behavior than DSB1

8. Visualize the data on a genome browser, such as the Integrated Genome Browser (IGB) (<https://bioviz.org/>) or the Integrated Genomic Viewer (IGV) (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>) (Fig. 3).
9. Sorting DSBs according to the HR/NHEJ ratio. The ratio between RAD51 and XRCC4 (or BLESS signal *see Note 5*) is further calculated by summing the Rad51 signal on a 4 kb window centered on each annotated DSBs, divided by the summed XRCC4 signal (or the BLESS signal, *see Note 5*) on a 500-bp window. The source code can be found in the github page <https://github.com/LegubeDNAREPAIR/His toneMapping>, where The R script `get_repair_classes.R` is used to compute the normalized coverage of RAD51 over each DSB induced by AsiSI. This ratio further indicates the “HR prone-ness” of different DSBs (Fig. 3).

4 Notes

1. Formaldehyde and phenol/chloroform are toxic and must be manipulated under a chemical hood. Wear appropriate clothes and protection.
2. The chromatin sonication is a critical step in the procedure. We commonly use a Branson Sonifier 450 with a microtip (ten times 10 s: % duty cycle = 50; output = 5). Wear hearing protections. The best is to sonicate in a 15-mL falcon tube, with no less than 1.5 mL of extract. Make sure it does not foam. If it does, wait on ice. Wait 1 min on ice between each sonication of 10 s. Alternative solutions for sonication exist including

the Bioruptor (Diagenode) or the Ultra Focused sonicator (Covaris). The sonication efficiency shall be checked by doing the following steps:

- Take ~5 μg of chromatin and add TE buffer qsp 200 μL .
 - Proceed to the steps described in Subheadings 3.4 (steps 8 and 9) and 3.5 (steps 1–8).
 - Resuspend in 10 μL of DNase- and RNase-free water.
 - Incubate 5 min at 65 $^{\circ}\text{C}$.
 - Run the 10 μL on a 2% agarose gel.
 - A smear with a bulk signal between 200 bp and 2 kb is expected (Fig. 1).
3. At this step, the unused chromatin can be snap frozen in liquid nitrogen and stored for few months at -80°C .
 4. The Rad51 antibody from Santacruz is now discontinued, it can be replaced by the Abcam antibody #ab176458. The efficiency of this antibody has been tested and validated by ChIP-qPCR (Fig. 2).
 5. With the development of techniques based on the pull-down and sequencing of DSBs ends (BLESS, BLISS, End-seq, etc.), it is possible to replace the XRCC4 immunoprecipitation by any of this method in order to evaluate the level of DSB induction (Fig. 4).

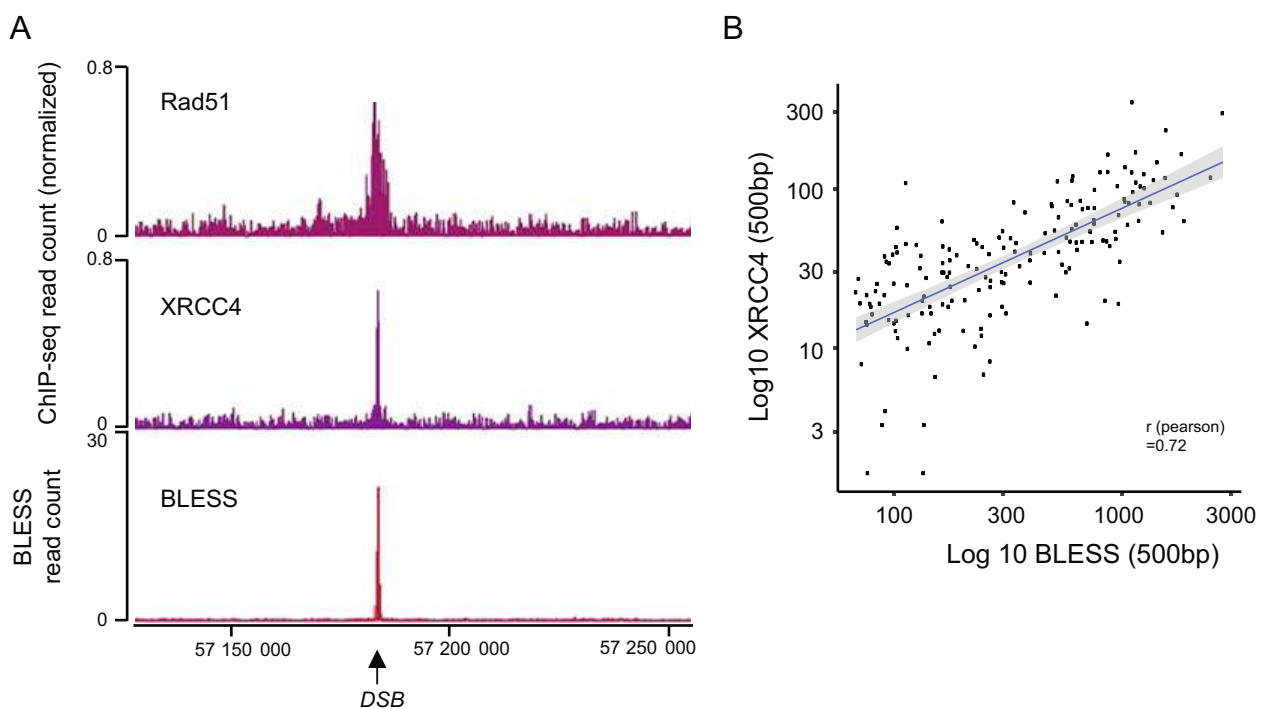


Fig. 4 Using BLESS rather than XRCC4 ChIP-seq to normalize Rad51 recruitment against cleavage efficiency. A. Genome browser view of Rad51 ChIP-seq signal at a DSB site. The level of DSB induction can be assessed in parallel by ChIP-seq against XRCC4 or by BLESS. B. Scatterplot showing the Log10 of the XRCC4 signal against the Log 10 of the BLESS signal summed on 500 bp around each of the 174 DSBs induced by AsiSI [8]

Acknowledgment

Funding in G.L. laboratory is provided by grants from the European Research Council (ERC-2014-CoG 647344), Agence Nationale pour la Recherche (ANR-14-CE10-0002-01), the Institut National contre le Cancer (INCA), and the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC). C.A salary is provided by FRM (Fondation pour la Recherche Medicale) (FRM FDT201904007941).

References

1. Marnef A, Cohen S, Legube G (2017) Transcription-coupled DNA double-strand break repair: active genes need special care. *J Mol Biol* 429:1277–1288. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.024>
2. Sollier J, Cimprich KA (2015) Breaking bad: R-loops and genome integrity. *Trends Cell Biol* 25:514–522. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.05.003>
3. Gaillard H, Aguilera A (2016) Transcription as a threat to genome integrity. *Annu Rev Biochem* 85:291–317. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014908>
4. Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G (2016) DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin Cancer Biol* 37–38:51–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.03.003>
5. Fortuny A, Polo SE (2018) The response to DNA damage in heterochromatin domains. *Chromosoma* 127:291–300. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0669-6>
6. Clouaire T, Legube G (2015) DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision? *Nucleus* 6:107–113. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1010946>
7. Aymard F, Bugler B, Schmidt CK et al (2014) Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 21:366–374. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2796>
8. Clouaire T, Rocher V, Lashgari A et al (2018) Comprehensive mapping of histone modifications at DNA double-strand breaks deciphers repair pathway chromatin signatures. *Mol Cell* 72:250–262.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.020>
9. Crosetto N, Mitra A, Silva MJ et al (2013) Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods* 10:361–365. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2408>
10. Yan WX, Mirzazadeh R, Garnerone S et al (2017) BLISS is a versatile and quantitative method for genome-wide profiling of DNA double-strand breaks. *Nat Commun* 8:15058. <https://doi.org/10.1038/ncomms15058>
11. Biernacka A, Zhu Y, Skrzypczak M et al (2018) i-BLESS is an ultra-sensitive method for detection of DNA double-strand breaks. *Commun Biol* 1:181. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0165-9>
12. Lensing SV, Marsico G, Hänsel-Hertsch R et al (2016) DSBcapture: in situ capture and sequencing of DNA breaks. *Nat Methods* 13:855–857. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3960>
13. Canela A, Sridharan S, Sciascia N et al (2016) DNA breaks and end resection measured genome-wide by end sequencing. *Mol Cell* 63:898–911. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.034>
14. Iacovoni JS, Caron P, Lassadi I et al (2010) High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J* 29:1446–1457. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.38>
15. Canela A, Maman Y, Huang S-YN et al (2019) Topoisomerase II-induced chromosome breakage and translocation is determined by chromosome architecture and transcriptional activity. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.030>
16. Gothe HJ, Bouwman BAM, Gusmao EG et al (2019) Spatial chromosome folding and active transcription drive DNA fragility and formation of oncogenic MLL translocations. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.015>

Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes

François Aymard^{1,6}, Marion Aguirrebengoa^{1,6}, Emmanuelle Guillou^{1,6}, Biola M Javierre², Beatrix Bugler¹, Coline Arnould¹, Vincent Rocher¹, Jason S Iacovoni³, Anna Biernacka⁴, Magdalena Skrzypczak⁴, Krzysztof Ginalski⁴, Maga Rowicka⁵, Peter Fraser² & Gaëlle Legube¹

The ability of DNA double-strand breaks (DSBs) to cluster in mammalian cells has been a subject of intense debate in recent years. Here we used a high-throughput chromosome conformation capture assay (capture Hi-C) to investigate clustering of DSBs induced at defined loci in the human genome. The results unambiguously demonstrated that DSBs cluster, but only when they are induced within transcriptionally active genes. Clustering of damaged genes occurs primarily during the G1 cell-cycle phase and coincides with delayed repair. Moreover, DSB clustering depends on the MRN complex as well as the Formin 2 (FMN2) nuclear actin organizer and the linker of nuclear and cytoplasmic skeleton (LINC) complex, thus suggesting that active mechanisms promote clustering. This work reveals that, when damaged, active genes, compared with the rest of the genome, exhibit a distinctive behavior, remaining largely unrepaired and clustered in G1, and being repaired via homologous recombination in postreplicative cells.

Translocations, which occur when two DNA DSBs are abnormally rejoined, are highly deleterious genome rearrangements favoring cancer initiation and progression. However, the mechanisms that drive their formation remain poorly understood. One prerequisite for translocation is the juxtaposition of two distant DSBs, an event that would be favored if DSBs cluster, i.e. are brought together in spatial proximity within the nucleus. In budding yeast, a *lacO*- or *TetO*-tagged genomic locus exhibits increased motion when it is damaged with the I-SceI endonuclease. Intriguingly, this phenomenon, referred to as ‘local mobility’, is accompanied by a ‘global mobility’ process whereby the other chromosomes also explore wider volumes in the nuclear space, although to a lesser extent than the damaged locus itself^{1–3}. Moreover, induction of two DSBs by the HO and I-SceI endonucleases triggers formation of a single Rad52 focus, thus suggesting that DSBs can indeed coalesce in yeast⁴.

However, whether DSBs cluster in higher eukaryotes has been a subject of controversy over the past decade, owing to conflicting results obtained through microscopy-based methods (refs. 5–13; reviewed in ref. 14). On the one hand, DSBs induced on a linear tract by α -particles, etoposide or high doses of radiation can move over long distances and cluster over time^{5–8}. In addition, DSBs induced at subtelomeric regions in cells that use alternative lengthening of telomeres for telomere maintenance or that are induced by a restriction enzyme (AsiSI) undergo clustering^{15,16}. Finally, DSB tracking in

thousands of cells by using high-throughput time-lapse microscopy has revealed that two damaged loci can frequently be juxtaposed and lead to translocation¹⁷. However, in other studies, X-ray or heavy-ion-induced DSBs have not been found to exhibit this distinctive behavior, and dynamic analysis of a single broken chromosome end has shown only small-scale local motion^{9–13}, thus arguing against clustering.

DSBs are repaired primarily by homologous recombination (HR) and nonhomologous end joining (NHEJ), both of which rely on profoundly different mechanisms. NHEJ directly reseals the two DNA ends and is available throughout the cell cycle. In contrast, HR uses a homologous copy of the broken locus as a template. It relies on the generation of single-strand DNA, in a process called resection, which is initiated by the MRN complex and is followed by nucleoprotein-filament assembly, homology search, strand invasion and DNA synthesis (reviewed in ref. 18). Importantly this pathway is strongly suppressed during the G1 cell-cycle phase, most probably to minimize the use of an illegitimate copy as a template¹⁹. Beyond the tight control exerted by the cell-cycle stage on repair-pathway usage, a growing body of evidence suggests that repair is also regulated by chromatin and varies across the genome (reviewed in ref. 20). High-resolution genome-wide-scale profiles of RAD51 and XRCC4 (which are involved in HR and NHEJ, respectively), after induction of multiple sequence-specific DSBs by a restriction enzyme (AsiSI), have revealed that, in postreplicative cells, DSBs in intergenic regions or silent genes are

¹LBCMCPC, Centre de Biologie Integrative (CBI), CNRS, Université de Toulouse, UT3, Toulouse, France. ²Nuclear Dynamics Programme, Babraham Institute, Cambridge, UK. ³Bioinformatic Plateau I2MC, INSERM and University of Toulouse, Toulouse, France. ⁴Laboratory of Bioinformatics and Systems Biology, Centre of New Technologies, University of Warsaw, Warsaw, Poland. ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, USA. ⁶These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to G.L. (gaelle.legube@univ-tlse3.fr).

Received 2 September 2016; accepted 7 February 2017; published online 6 March 2017; doi:10.1038/nsmb.3387

repaired primarily by NHEJ, whereas those occurring in active genes are channeled to HR²¹. Trimethylated K36 of histone H3 (H3K36me3), a histone mark previously linked to transcriptional elongation, contributes to target HR at transcriptionally active loci^{21–24}.

Because the initial chromatin context controls the repair-pathway choice and because the ability of a locus to roam in the nucleus has been proposed to be regulated by the chromatin-compactness state (e.g., in ref. 25), we hypothesized that the propensity of DSBs to cluster may also depend on the properties of the broken loci, i.e., their genomic positions. Here, to assess this hypothesis, we examined clustering among AsiSI-induced DSBs scattered throughout the genome and located in both transcriptionally active and inactive regions, by using a chromosome conformation capture (3C)-derivative technique (capture Hi-C²⁶). We found that DSB clustering occurs primarily among breaks induced in active genes, during G1, in a manner dependent on the nuclear actin organizer FMN2 and the LINC complex. Furthermore, clustering correlates with delayed repair in G1; hence, instead of promoting repair, clustering may contribute to ‘sequestration’ of persistent DSBs.

RESULTS

Capture Hi-C experimental design in DivA cells

The DivA (DSB inducible via AsiSI) human cell line allows for the induction of approximately 100 DSBs within euchromatin (because AsiSI activity is inhibited by DNA methylation) after treatment with 4-hydroxytamoxifen (4OHT)^{21,27}. Using time-lapse microscopy, we have recently found that AsiSI-induced DSBs exhibit clustering in an ATM-dependent manner¹⁶. However, the identities of DSBs able to coalesce, among the 100 breaks induced by AsiSI, were unknown. To identify those DSBs, we performed Hi-C followed by sequence capture and high-throughput sequencing (capture Hi-C)²⁶ (Fig. 1a). Capture probes were designed throughout γ -H2AX domains established after DSB induction in DivA cells²¹ and surrounding the 100 most cleaved AsiSI sites *in vivo* (details in **Supplementary Note**). Three control regions of equivalent size (2 Mb) but lacking DSBs were included. An average of 50 probes were designed per domain with a high coverage of the immediate vicinity of the DSB in a ± 10 -kb window (one probe per HindIII fragment, i.e., per 5 kb) and with lower

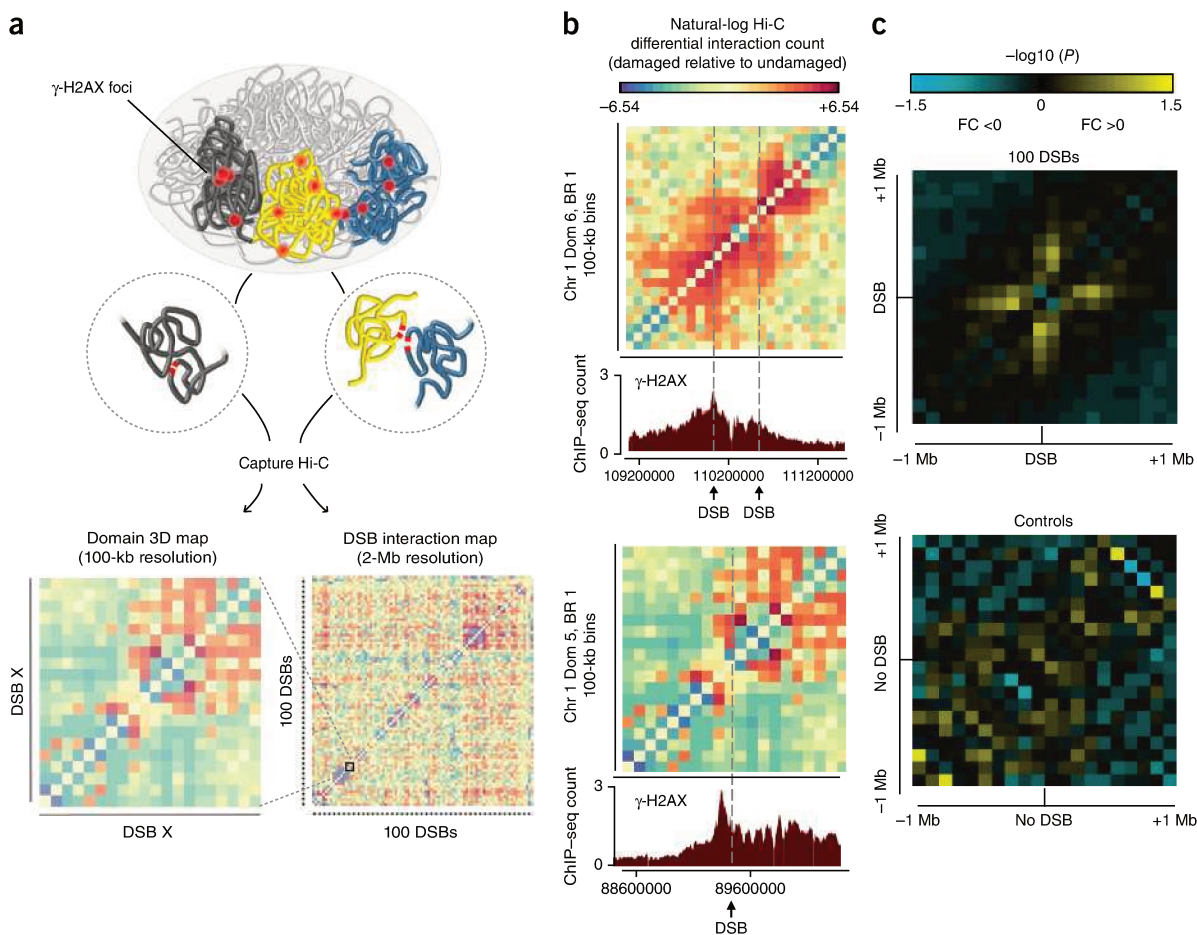


Figure 1 Capture Hi-C reveals DSB-induced local changes in chromosome folding. **(a)** Diagram of the experimental pipeline: DSBs are introduced at known positions throughout the human genome after 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) treatment. Capture Hi-C experiments are conducted both before and after DSB induction to identify DSBs that interact within the nucleus after damage (as detailed in **Supplementary Note**). 100-kb-resolution contact maps determine changes in *cis* interaction within γ -H2AX domains, whereas 2-Mb-resolution interaction maps allow for identification of domains capable of interacting (i.e., clustering) after damage. **(b)** 100-kb-resolution differential interaction map of damaged versus undamaged cells, shown for two domains (Dom) captured on chromosome 1. Data are expressed as the natural log of the differential interaction count (normalized to the number of captured reads and probe number, as outlined in Online Methods). Arrows indicate DSB positions. The γ -H2AX profiles obtained by ChIP-seq at the same chromosomal locations²¹ after damage are shown below the maps. **(c)** Averaged interaction heat map between damaged versus undamaged cells at 100-kb resolution within 2-Mb captured domains, around the 100 DSBs (top) or around the three control domains lacking DSBs (bottom). Adjusted P values were computed with Edge R, on the basis of capture Hi-C analyses from two independent cell cultures (as outlined in Online Methods). $-\log_{10}(P)$ values are indicated, with negative fold changes (damaged < undamaged) in blue and positive fold changes (damaged > undamaged) in yellow.

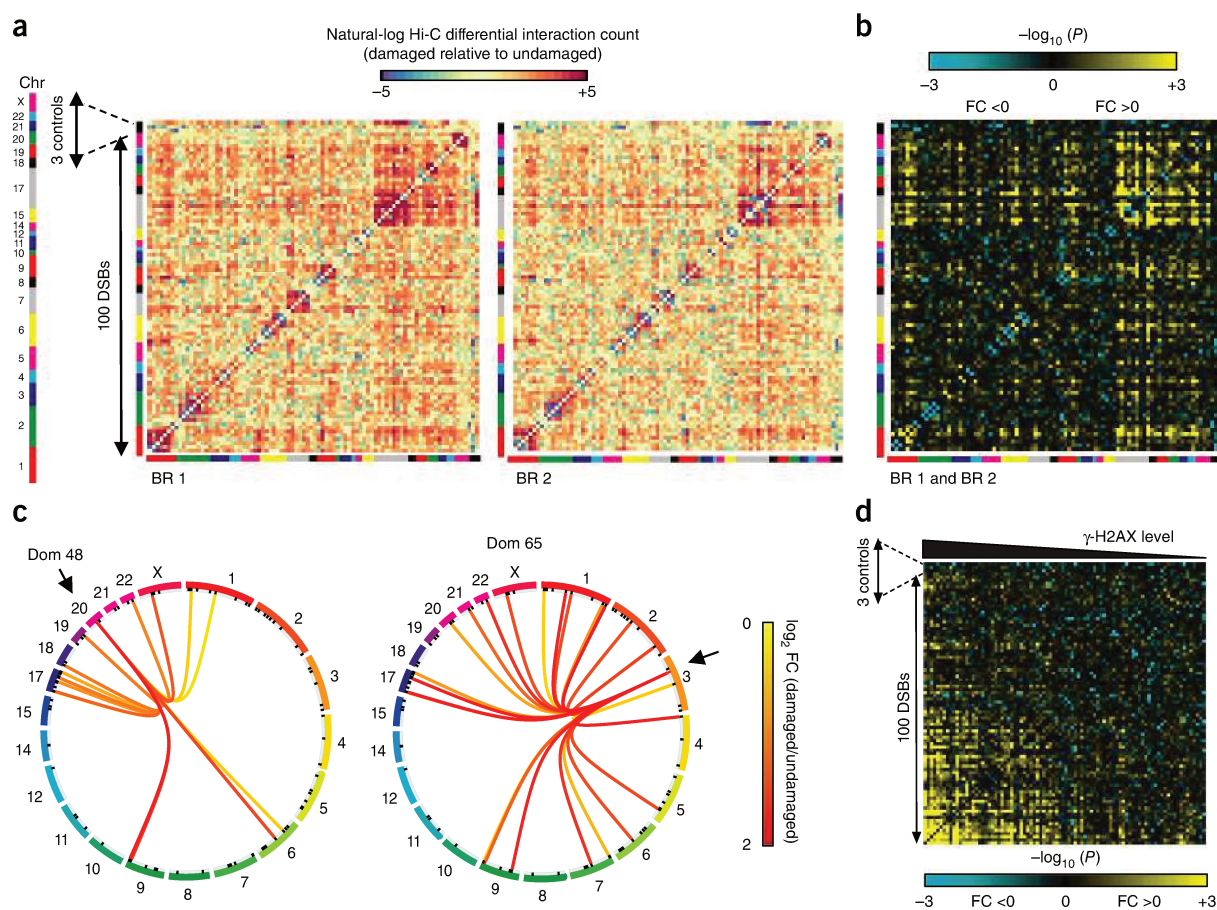


Figure 2 Clustering occurs for DSBs induced on different chromosomes and correlates with γ -H2AX level. **(a)** Differential heat maps representing the differential interaction (damaged versus undamaged) between each 2-Mb domain captured on the human genome, computed from capture Hi-C experiments from two independent cell cultures (indicated as biological replicate (BR) 1 and BR 2). Data are expressed as the natural log of the number of differential interaction counts. DSBs are ordered according to their positions on the genome, and chromosomes (chr) are indicated by colored bars. The three control regions lacking DSBs are positioned at the end (black line). Each square depicts the differential interaction obtained between one DSB containing a captured domain and another (as described in **Supplementary Note**). **(b)** The numbers of interactions between domains were measured, and adjusted P values between damaged and undamaged samples were computed on the basis of the Capture Hi-C data sets obtained from two independent cell cultures, by using Edge R (as outlined in Online Methods). $-\log_{10}(P)$ values are indicated, with negative fold changes (FC < 0, damaged < undamaged) in blue and positive fold changes (FC > 0, damaged > undamaged) in yellow. DSBs are ordered according to their positions in the genome, and chromosomes are indicated by colored bars. The three control regions lacking DSBs are positioned at the end, as in **a**. **(c)** Circos plots showing the statistically significant (adjusted $P < 0.05$) interactions induced after 4OHT treatment for two selected DSB-containing captured domains. Connecting lines are colored according to the \log_2 fold change between damaged and undamaged cells. Adjusted P values were calculated from damaged and undamaged samples from capture Hi-C experiments on two independent cell cultures by using EdgeR (Online Methods). **(d)** Interaction heat map between damaged versus undamaged cells at a 2-Mb domain resolution, sorted on the basis of γ -H2AX level. Adjusted P values between damaged and undamaged samples were calculated on the basis of a capture Hi-C data set obtained from two independent cell cultures, by using Edge R (outlined in Online Methods). $-\log_{10}(P)$ values are indicated, with negative fold changes (damaged < undamaged) in blue and positive fold changes (damaged > undamaged) in yellow. DSBs are sorted on the basis of their γ -H2AX level, as analyzed by ChIP-seq²¹. Controls are indicated on the left side of the matrix. Dom, domain.

coverage of the rest of the domain (one probe per ten HindIII fragments, i.e., per approximately 50 kb) (**Supplementary Tables 1 and 2**). Capture Hi-C was performed in undamaged or damaged cells, in two biological replicates from independent cell cultures. Ditag analyses behaved as expected, thus indicating that both 3C libraries and capture steps worked efficiently (**Supplementary Fig. 1a–c**). Both replicates exhibited a strong correlation (**Supplementary Fig. 1d,e**).

Cis interactions are increased within γ -H2AX domains after damage

To visualize the interaction data, differential contact matrices between untreated and treated samples were calculated at 100-kb resolution on captured regions. Interestingly, we observed changes

in *cis* interactions within γ -H2AX domains after damage, in both independent biological replicates (**Fig. 1b** and **Supplementary Fig. 2**). On average, *cis* interactions were reproducibly enhanced around DSBs after damage, in contrast to control regions (**Fig. 1c**). An increased contact frequency was observed on both sides of the break, over a region spanning approximately 1 Mb (500 kb on each side), a size reminiscent of the average size of γ -H2AX domains. The interaction pattern, observed as a cross centered on the DSB (**Fig. 1c**), indicated that the regions surrounding the break frequently come into contact with the DSB and further supported our previous hypothesis that H2AX phosphorylation is sustained through direct contact of loci *in cis* with the DSB²⁸.

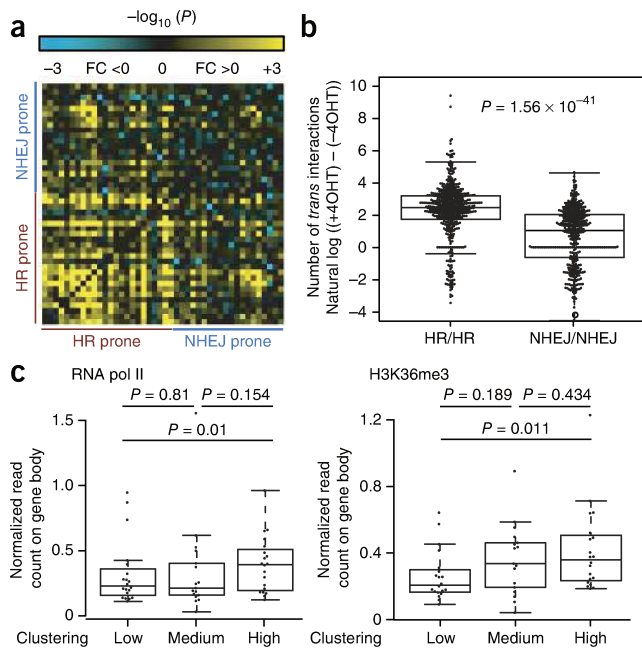


Figure 3 DSBs within transcriptionally active genes that are repaired by homologous recombination in postreplicative cells undergo clustering. **(a)** Interaction heat map between damaged versus undamaged cells at 2-Mb domain resolution for DSBs defined as HR prone or NHEJ prone²¹ (as detailed in Online Methods). *P* values were computed as described in **Figure 2b**. $-\log_{10}(P)$ values are indicated, with negative fold changes (damaged < undamaged) in blue and positive fold changes (damaged > undamaged) in yellow. **(b)** Box plot showing the distribution of DSB-induced interactions between each HR-prone DSB with any other HR-prone DSB (HR/HR), or each NHEJ-prone DSB with any other NHEJ-prone DSB (NHEJ/NHEJ). The difference between the two classes is highly significant (two-sided Wilcoxon Mann–Whitney test, HR/HR, $n = 506$ pairs; NHEJ/NHEJ, $n = 420$ pairs). Center line, median; box limits, first and third quartiles; whiskers, maximum and minimum without outliers; points, outliers (Online Methods). **(c)** DSBs were classified according to their ability to cluster (ranked as high, medium and low). RNA polymerase II occupancy (left) and H3K36me3 enrichment (right), analyzed in DivA cells by ChIP-seq (ref. 21 and Online Methods) were averaged over the closest genes. Highly clustered DSBs also exhibited the highest RNA polymerase II and H3K36me3 levels (two-sided Wilcoxon Mann–Whitney test, low, $n = 20$ DSBs; medium, $n = 17$ DSBs; high, $n = 20$ DSBs). Center line, median; box limits, first and third quartiles; whiskers, maximum and minimum without outliers; points, outliers (Online Methods). Source data are available online.

Clustering occurs between DSBs induced on the same or different chromosomes

To identify DSBs capable of interacting (i.e., clustering), we next created differential contact matrices (damaged versus undamaged) for all 2-Mb domains for each replicate. Individual captured domains were first sorted on the basis of their order of appearance in the genome (from chromosome 1 to chromosome X, colored lines), and the three control regions were placed at the end of the matrix (black line). The heat maps for the pairs of independent replicates showed strong similarity (**Fig. 2a**). The statistical contact matrix, based on both replicates, clearly indicated that some but not all genomic loci tend to interact when they are damaged (**Fig. 2b**). Although smaller chromosomes (chromosomes 17–22), which tend to be located in the center of the nucleus²⁹, presented more clustered DSBs than longer ones, we did not find any correlation between the positions of the DSBs in the nucleus and the clustering ability (**Supplementary Fig. 3a**).

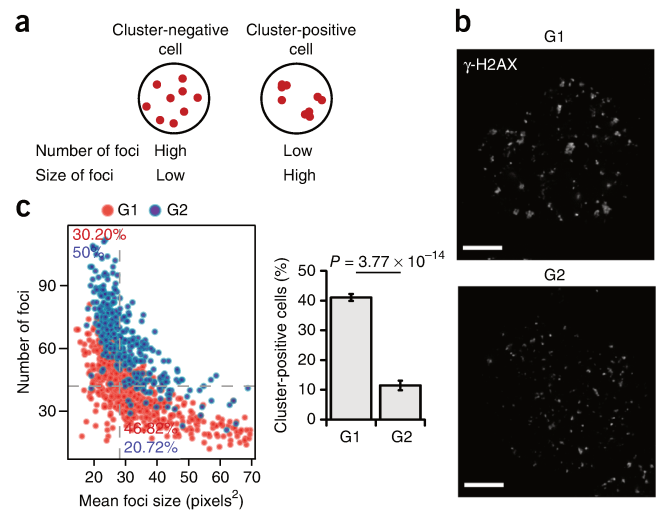


Figure 4 DSB clustering is favored during the G1 cell-cycle phase. **(a)** AsiSI induces a known number of DSBs in a homogeneous fashion within the cell population. Determination of the numbers and sizes of γ -H2AX foci in each nucleus can thus be used to infer clustering. Low clustering ability leads to more and smaller foci (left, cluster-negative cells), whereas high clustering ability leads to fewer and larger foci (right, cluster-positive cells). **(b)** G1 and G2 DivA nuclei that were synchronized by a double thymidine block followed by release (for 15 h and 8 h, respectively) and stained for γ -H2AX were visualized by immunofluorescence after DNA-damage induction. Scale bar, 5 μ m. **(c)** DivA cells were treated with 4OHT (4 h) and subjected to high-throughput microscopy after γ -H2AX staining. Left, scatter plot obtained for a representative experiment, showing the number of γ -H2AX foci (y axis) and the average focus size (x axis) for each cell in G1 or in G2 (on the basis of Hoechst staining, **Supplementary Fig. 5a**). The plot is divided into four areas on the basis of the median focus number and size (dotted gray lines). Percentages of cells from the G1 (in red) or G2 population (in blue) that are cluster positive (bottom right) or cluster negative (top left) are indicated. Right, quantification showing the percentage of cluster-positive cells in G1 and G2. Mean, s.e.m. and *P* value (paired two-sided *t* test) are shown ($n = 14$ independent experiments). Source data are available online.

Visualization of Hi-C data with circos plots clearly indicated that DSB-induced long-range interactions were not restricted to the same chromosome and that clustering also occurred between DSBs induced on different chromosomes (**Fig. 2c** and **Supplementary Fig. 3b**). In addition, DSBs clustering was favored between loci that were initially in proximity (**Supplementary Fig. 3a–c**), but DSBs induced on physically close domains (belonging to the same chromosome, **Supplementary Fig. 3c**, left) did not necessarily cluster, thus indicating that spatial proximity is probably required but is not sufficient for DSB clustering. Finally, when DSBs were sorted on the basis of damage-induced γ -H2AX levels obtained by chromatin immunoprecipitation (ChIP)-seq in DivA cells²¹, the DSBs exhibiting higher γ -H2AX levels demonstrated a higher ability to cluster (**Fig. 2d**). Altogether, these data indicated that DSBs in the human genome can undergo clustering even when they are induced on different chromosomes, in a manner correlated with the level of γ -H2AX.

Clustering is enhanced between DSBs induced in transcriptionally active regions

In a previous study, we discovered that all DSBs induced in the genome are not necessarily repaired by HR in postreplicative cells, even though the sister chromatid is available. Indeed, on the basis of

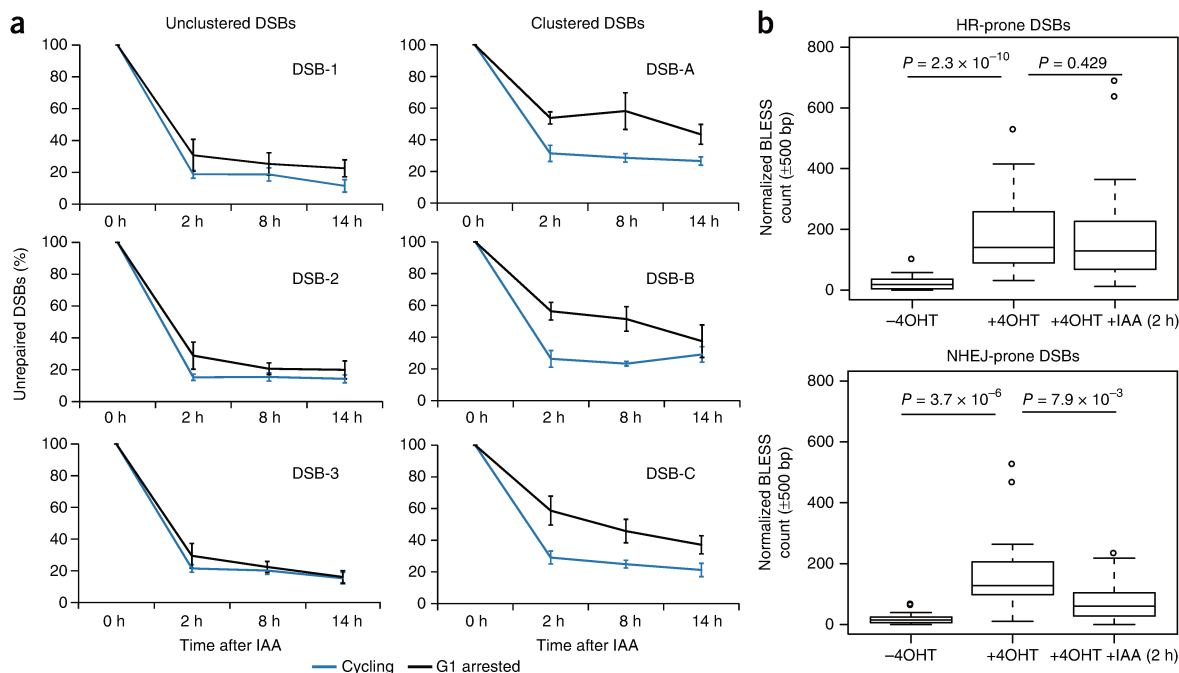


Figure 5 Clustered HR-prone DSBs exhibit delayed repair in G1. **(a)** After DSB induction by 4OHT, repair kinetics was measured after auxin (IAA) addition to trigger AsiSI degradation and subsequent DSB repair. Three unclustered (left) or three clustered (right) DSBs in either cycling cells (blue) or G1-arrested cells (after lovastatin treatment, black) were monitored. We assessed repair kinetics by collecting cells at the indicated time points after auxin addition and performing ligation- and purification-mediated quantitative PCR (described in refs. 21,36; **Supplementary Fig. 5c**). DSB levels before auxin addition (time point 0 h) were set to 100%. **(b)** BLESS, performed in DivA cells synchronized in G1. Cells were left untreated or were treated with 4OHT (4 h) or 4OHT and IAA (2 h) (**Supplementary Fig. 6**). The normalized BLESS read count is shown in a ± 500 -bp window surrounding HR-prone (top) or NHEJ-prone (bottom) DSBs for each condition indicated. *P* values, calculated by two sided Wilcoxon Mann–Whitney tests, are indicated (HR prone, $n = 30$ DSBs; NHEJ prone $n = 30$ DSBs). Center line, median; box limits, first and third quartiles; whiskers, maximum and minimum without outliers; points, outliers (Online Methods). Source data are available online.

RAD51 and XRCC4 ChIP-seq data, we determined the repair pathway used at each AsiSI-induced DSB and found that in G2, DSBs induced in active gene bodies or promoters were repaired primarily by HR (hereafter designated as HR prone); in contrast, DSBs induced in silenced regions were unable to recruit RAD51 and instead underwent NHEJ (hereafter designated as NHEJ prone)²¹. We thus wondered whether DSB clustering might depend on the pathway used for repair. Strikingly, sorting the captured domains on the basis of RAD51 ChIP-seq signal revealed that DSBs with high levels of RAD51 recruitment also showed statistically significantly increased clustering (**Supplementary Fig. 4a**). Enhanced clustering was observed at HR-prone compared with NHEJ-prone DSBs (**Fig. 3a**), and interactions among the HR-prone loci after damage were significantly higher than interactions among NHEJ-prone DSBs (**Fig. 3b**). Importantly, analysis of DSBs levels in DivA cells confirmed that the cleavage efficiency was similar in both categories (**Supplementary Fig. 4b**), thus indicating that the differential behavior of HR-prone and NHEJ-prone DSBs toward clustering was not due to DSB induction efficiency.

Because HR-prone DSBs occurred primarily within active genes, we further investigated the correlation between clustering ability and the transcriptional status of the damaged locus. RNA polymerase II occupancy and H3K36me3 enrichment (indicators of transcriptional activity) previously analyzed by ChIP-seq in DivA cells²¹ were calculated at DSB regions exhibiting low, medium or high clustering ability (Online Methods). DSBs that exhibited high clustering were located in regions with the highest transcriptional activity (**Fig. 3c**). Altogether, these data indicated that in human cells, DSBs are able to cluster, but this distinctive behavior is favored at

breaks that are induced in transcriptionally active chromatin and are repaired by HR in postreplicative cells.

Clustering is enhanced during the G1 cell-cycle phase

The preferential occurrence of clustering at DSBs repaired by HR may indicate that clustering is somehow linked to homology search, a process required for HR and probably involving enhanced chromatin mobility². However, previous studies have suggested that clustering is enhanced in the G1 phase of the cell cycle⁵, during which HR is strongly inhibited¹⁹. This apparent contradiction prompted us to investigate whether DSB clustering was also enhanced in G1 in DivA cells. Importantly, we have previously found by ChIP-microarray (ChIP-chip) analysis that both the number of DSBs induced by AsiSI and the extent of γ -H2AX spreading are identical between G1 and G2 (ref. 27). Hence, clustering can also be inferred by measuring the numbers and sizes of γ -H2AX foci detected within the nuclei (**Fig. 4a**). Larger foci were observed in G1 compared with G2 cells (**Fig. 4b**). To systematically measure the number and size of γ -H2AX foci in a large number of G1 and G2 damaged nuclei, we performed high-throughput microscopy (Online Methods). Cell-cycle stages were determined with Hoechst staining (**Supplementary Fig. 5a**). For each cell, the number of γ -H2AX foci was plotted against the average focus size, and ‘clustering-positive cells’ were defined as cells exhibiting a low number of large foci (corresponding to the bottom-right gate in **Fig. 4c**, left; details in Online Methods). This analysis revealed a robust and significant decrease in the number of cluster-positive cells in G2 compared with G1 (**Fig. 4c**, right). In agreement with this finding, in G2, compared with G1, foci were smaller on average, whereas

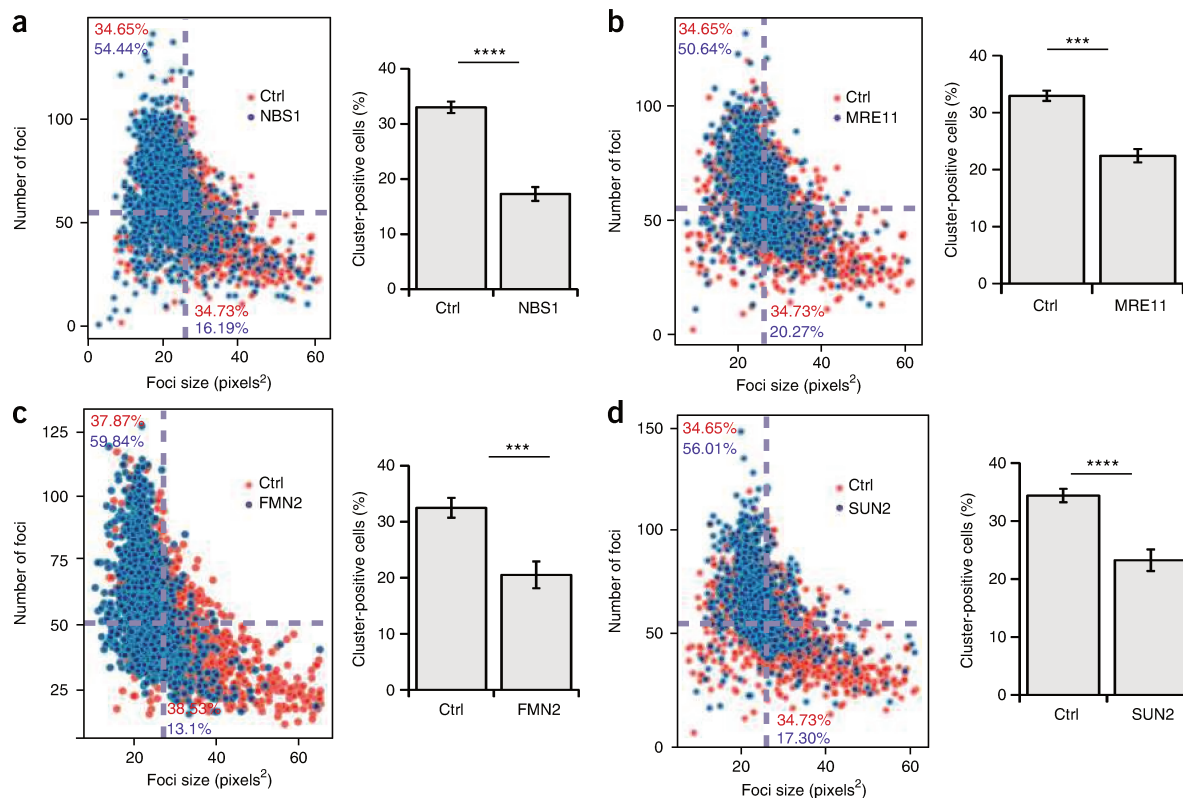


Figure 6 DSB clustering depends on the MRN complex as well as on the LINC complex and the FMN2 actin organizer. (a) DivA cells were transfected with control siRNA (red) or a siRNA against NBS1 (blue), treated with 4OHT (4 h) and subjected to high-throughput microscopy after γ -H2AX staining. Left, average focus size (x axis) and number of foci (y axis), determined in each cell and plotted as in **Figure 4c**. Right, quantification (mean \pm s.e.m.) of cluster-positive cells obtained from $n = 5$ independent experiments. (**** $P < 0.001$ by paired two-sided t test). Ctrl, control. (b) As in **a**, except that a siRNA against MRE11 was used ($n = 3$ independent experiments) (** $P < 0.005$ by paired two-sided t test). (c) As in **a**, except that a siRNA against FMN2 was used ($n = 7$ independent experiments) (** $P < 0.005$ by paired two-sided t test). (d) As in **a**, except that a siRNA against SUN2 was used ($n = 6$ independent experiments) (**** $P < 0.001$ by paired two-sided t test). Source data are available online.

the number of foci was higher on average (**Supplementary Fig. 5b**). Altogether, these data indicated enhanced DSB clustering in G1.

Clustered, HR-prone DSBs exhibit delayed repair

Notably, long-range mobility of DSBs has often been associated with ‘persisting breaks’ or delayed repair. For example, unrepairable DSBs in yeast move toward the nuclear periphery^{30,31}. Similarly, in higher eukaryotes, DSBs induced in heterochromatin or in ribosomal DNA also exhibit relocalization to the periphery of the heterochromatin focus^{32,33} or the nucleolus, respectively^{34,35}—two subnuclear compartments that have been suggested to be refractory to efficient repair. Therefore, the clustering of damaged active genes observed in G1 may reflect delayed repair. Hence, we measured repair kinetics at clustered and unclustered DSBs in G1-arrested cells compared with cycling cells. Briefly, we used a previously developed assay^{21,36} (Online Methods) that allows purification and qPCR-mediated quantification of DSB levels in damaged cells (4OHT) or at different time points during repair (after auxin addition), (**Supplementary Fig. 5c** and **Supplementary Table 3**). Importantly, lovastatin treatment performed to arrest the cells in G1 (**Supplementary Fig. 5d**) did not alter the auxin-induced degradation of AsiSI (**Supplementary Fig. 5e**). Remarkably, three selected DSBs that undergo clustering in G1 (**Fig. 5a**, right) exhibited delayed repair in G1-arrested cells compared with normally cycling cells, even 8 h after auxin addition. In contrast, unclustered DSBs were rapidly repaired in both cycling or G1-arrested cells (**Fig. 5a**, left).

To assess the repair kinetics in G1 on a global scale, we further performed direct *in situ* breaks labeling, enrichment on streptavidin and next-generation sequencing (BLESS), a technique developed to capture and identify DSB positions at the genome-wide level^{37,38} (**Supplementary Fig. 6a,b**). Analyses of BLESS data indicated that DSBs were induced in G1 after 4OHT addition and were partially repaired after 2 h of auxin treatment (example in **Supplementary Fig. 6c**; averaged signal at AsiSI sites in **Supplementary Fig. 6d**). We found that, whereas NHEJ-prone DSBs exhibited almost complete repair 2 h after auxin addition, HR-prone DSBs remained largely unrepaired (**Fig. 5b**). Altogether, these data indicated that DSBs induced during G1 in transcriptionally active genes are not fully proficient for repair and are prone to clustering.

MRN, FMN2 and the SUN2 component of the LINC complex sustain clustering

To gain insights into the mechanisms that might mediate clustering, we further used high-throughput microscopy combined with short interfering RNA (siRNA)-mediated depletion of selected candidates (**Supplementary Fig. 7** and **Supplementary Table 4**). Previous studies have implicated the MRN complex in promoting DSB mobility and clustering and in favoring translocation^{5,17}. Interestingly, depletion of both MRE11 and NBS1 led to a decrease in the number of cluster-positive cells and in the clustering index (**Fig. 6a,b** and **Supplementary Fig. 8**), thus further confirming the role of the MRN complex in clustering. Depletion of known components of the DNA-damage response (RNF8,

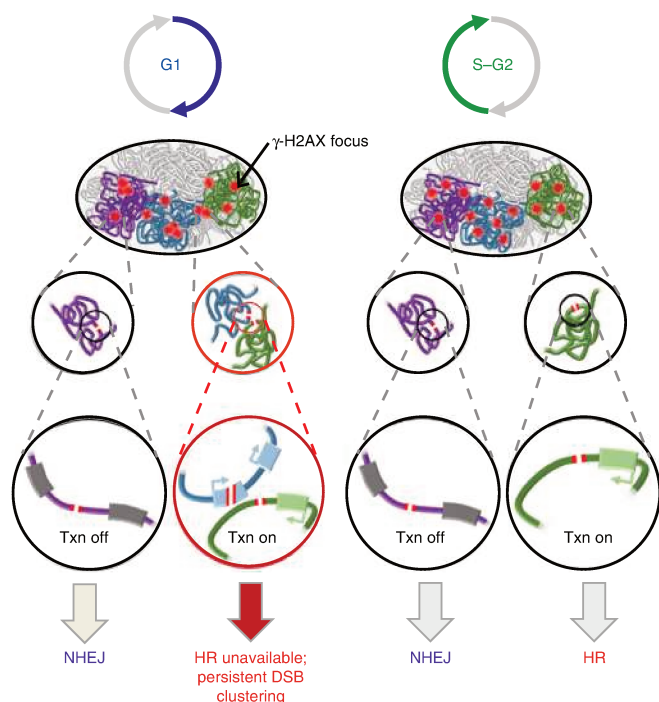


Figure 7 Model for DSB clustering. Whereas DSBs in intergenic regions and inactive genes are repaired primarily by NHEJ throughout the cell cycle, the repair of DSBs induced in active genes is dependent on the cell-cycle phase. In postreplicative cells, DSBs in transcribed regions are prone to HR repair, whereas in G1, those breaks persist longer and coalesce with one another, thus forming clusters of unrepaired active genes. Txn, transcription.

53BP1 and XRCC4) did not significantly alter clustering (**Supplementary Fig. 8a,b**). In addition, two recent studies have suggested roles for cytoskeleton proteins in DSB mobility and/or repair. On the one hand, disruption of the LINC complex, which is embedded in the nuclear envelope that connects the cytoskeleton to the nucleoskeleton, decreases DSB and unprotected telomere mobility within the nucleus³⁹. On the other hand, actin has been found to polymerize within the nucleus shortly after induction of DNA damage, in a manner dependent on the FMN2 actin organizer⁴⁰. We found that both pathways contribute to DSB clustering. Indeed, depletion of SUN2 (but not of SUN1) and FMN2 led to a decrease in cluster-positive cells and in the clustering index (**Fig. 6c,d** and **Supplementary Fig. 8a,b**). These data indicated that DSBs cluster in G1 in a manner dependent on the MRN complex and also on microtubule- and actin-related networks, thus suggesting that active mechanisms may be at work in this process. Finally, because clustering primarily involves DSBs induced in transcriptionally active regions, we investigated whether transcription inhibition would affect clustering. A pretreatment with 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB), a well-known transcription inhibitor, indeed led to decreased clustering (**Supplementary Fig. 8c,d**). However, such a decrease in clustering was not observed with another transcription inhibitor (triptolide), thus suggesting that transcription by itself is not responsible for the induced clustering of damaged active genes (as discussed further below).

DISCUSSION

The present analysis of long-range contacts after DSB induction enabled us to uncover a number of important features of the DNA-damage response. First, damage-induced changes within γ -H2AX domains

revealed a cross-shaped pattern, thus indicating that regions located in the ± 500 -kb region surrounding the DSB frequently come into contact with the break. We have previously reported that ATM, the main H2AX kinase, is recruited to restricted regions (~ 10 kb), whereas γ -H2AX spans windows of over 1–2 Mb (ref. 16). In addition, in budding yeast, the ATM and ATR homologs Tel1 and Mec1 are able to phosphorylate H2A *in trans*⁴¹. Therefore, we have previously proposed that γ -H2AX spreading is likely to occur through the dynamics of the chromatin fiber around DSBs, thus bringing distant H2AX-containing nucleosomes into the physical proximity of ATM bound in the vicinity of DNA ends^{14,28}. The observation that increased contacts between loci *in cis* and the break itself occurred in a region reminiscent of the γ -H2AX domain (1 Mb on average; **Fig. 1c**) lent further support to this hypothesis.

Moreover, we unambiguously established that DSBs can undergo clustering even between different chromosomes. Furthermore, we showed that the ability to cluster is not an intrinsic property of DSBs but instead depends on the nature of the damaged locus, because DSBs cluster only when they are induced in transcriptionally active genes. This observation probably accounts for the discrepancies previously reported in other studies, because various DNA-damaging agents do not necessarily induce DSBs at equivalent genomic locations. Notably, it has previously been shown that translocations occur primarily in active genes^{42–45}. Although this phenomenon has been attributed to an increased susceptibility of active genes to breakage, our results suggest that increased clustering of damaged active genes may also contribute to the translocation pattern.

Importantly, our study also revealed that DSBs induced in active genes, although they are repaired by HR in postreplicative cells, are refractory to repair in G1. We propose that these persisting breaks display large-scale motion and further coalesce within foci, as suggested by the observed enhanced clustering in G1 compared with G2 (**Fig. 7**). Interestingly, this behavior is reminiscent of that of other large-scale DSB-mobility events that have been almost systematically associated with persistent or ‘difficult’ DSBs^{30,32,35,46} (reviewed in ref. 14). The reasons underlying repair deficiency at active genes in G1 remain unknown. Although clustering was altered by DRB-mediated transcriptional inhibition (**Supplementary Fig. 8**), it was not decreased after treatment with other inhibitors (such as triptolide; data not shown). This finding suggests that the delayed repair observed at active genes should be attributed to chromatin and secondary DNA structures assembled at transcribed regions rather than to transcription itself. RNA polymerase II-machinery occupancy, supercoiling or RNA–DNA hybrids that form at transcribing loci⁴⁷ may delay resealing of broken ends, thus resulting in minimal resection, which would subsequently impede classical NHEJ. In postreplicative cells, such processed ends would be further processed by the HR machinery. In contrast, in G1, these DSBs would persist, owing to the downregulation of HR activity (**Fig. 7**). The involvement of MRN, whose activity sustains the initiation of resection, in clustering (**Fig. 6a,b**) further supports this hypothesis, although it remains to be established whether MRN contributes to clustering through promoting resection.

Given the increased risk of translocation associated with DSB clustering, one may wonder why this potentially deleterious mechanism has been selected during evolution. Studies in yeast have suggested DSB clustering may promote ‘repair center’ assembly, thereby concentrating and favoring recruitment of repair machineries. However, we found here that DSB clustering coincided with delayed repair, a finding that does not support the idea of repair centers in human cells. Instead, we favor the hypothesis that DSB clustering sequesters and/or prepares DSBs for faithful repair. Indeed, using the sole available

pathway that can accommodate resected or processed ends in G1, i.e., alternative NHEJ at damaged active genes, would be too detrimental for the cell, given the high mutation rate associated with this pathway. Clustering may help to inhibit such an error-prone repair pathway and/or to sequester DSBs from the rest of the genome until a more appropriate cell-cycle phase is reached.

Notably, mild replication stress leads to the formation of 53BP1- γ -H2AX bodies (also known as Oct-1, PTF, transcription (OPT) bodies) after chromosome breakage during mitosis, and these bodies persist throughout the G1 phase. These bodies have been proposed to contain common fragile sites^{48,49} previously shown to correlate with long genes^{50,51}. Hence, similarly to the DSB clusters described here, OPT bodies may contain multiple clustered DSBs that are induced at transcriptionally active long genes (which are under-replicated and damaged during the division) and that would be refractory to C-NHEJ repair in G1.

Finally we also provide insights into the mechanisms that promote DSB clustering. We found that clustering relies on nucleo- and cytoskeleton networks, because it depends on the LINC complex and FMN2 actin organizer (Fig. 6c,d). On the one hand, a function of the LINC complex has recently been identified in promoting DSBs and uncapped-telomere mobility in higher eukaryotes³⁹. Moreover, both in yeast and in *Drosophila*, LINC-subunit homologs contribute to the localization of unrepaired and heterochromatic DSBs to the nuclear periphery^{31,52,53}. Therefore, the LINC complex might exert an evolutionarily conserved role in promoting the mobility of persistent DSBs that would result in clustering or relocalization. On the other hand, nuclear actin has been found to polymerize within the nucleus after DNA damage, in a manner dependent on FMN2 (ref. 40), an actin-nucleator protein known to be phosphorylated and upregulated after DNA damage^{54,55}. Whether FMN2 contributes to DSB clustering through its ability to promote formation of nuclear actin filaments that would alter chromatin mobility thus represents an exciting possibility.

Because most of the cells in multicellular organisms are nonproliferative and are arrested in G1, it will be of utmost importance to integrate these novel concepts not only in the understanding of translocation processes but also in the view of adverse effects occurring during cancer chemo- and radiotherapy. The possibility that active mechanisms may be involved in translocations deserves close attention, because the cytoskeleton is a well-known and robust target for cancer therapy.

METHODS

Methods, including statements of data availability and any associated accession codes and references, are available in the [online version of the paper](#).

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the [online version of the paper](#).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Andrews, K. Tabbada and S. Wingett (Babraham Institute) for probe design and quality control of Hi-C data. Funding was provided by the Polish National Science Centre (2011/02/A/NZ2/00014 to K.G. and 2015/17/D/NZ2/03711 to M.S.) and the Foundation for Polish Science (TEAM to K.G.). Funding to M.R. was provided by NIH (NIH 5 R01 GM 112131). M.A. and E.G. were supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Funding in G.L.'s laboratory was provided by grants from the European Research Council (ERC-2014-CoG 647344), Agence Nationale pour la Recherche (ANR-14-CE10-0002-01 and ANR-13-BSV8-0013), the Institut National contre le Cancer (INCA PLBIO15-199) and the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.A., E.G., B.M.J., B.B. and C.A. performed experiments. M.A., V.R. and J.S.I. performed bioinformatic analyses of Hi-C and BLESS data sets. A.B., K.G.,

M.S., and M.R. performed BLESS experiments. P.F. contributed to capture Hi-C experimental design, experiments and analyses. G.L. conceived and analyzed experiments. F.A. and G.L. wrote the manuscript. All authors commented and edited the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B.D. & Gasser, S.M. Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nat. Cell Biol.* **14**, 502–509 (2012).
- Miné-Hattab, J. & Rothstein, R. Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nat. Cell Biol.* **14**, 510–517 (2012).
- Neumann, F.R. *et al.* Targeted INO80 enhances subnuclear chromatin movement and ectopic homologous recombination. *Genes Dev.* **26**, 369–383 (2012).
- Lisby, M., Mortensen, U.H. & Rothstein, R. Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat. Cell Biol.* **5**, 572–577 (2003).
- Aten, J.A. *et al.* Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* **303**, 92–95 (2004).
- Krawczyk, P.M. *et al.* Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Sci.* **125**, 2127–2133 (2012).
- Krawczyk, P.M., Stap, J., van Oven, C., Hoebe, R. & Aten, J.A. Clustering of double strand-containing chromosome domains is not inhibited by inactivation of major repair proteins. *Radiat. Prot. Dosimetry* **122**, 150–153 (2006).
- Neumaier, T. *et al.* Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 443–448 (2012).
- Becker, A., Durante, M., Taucher-Scholz, G. & Jakob, B. ATM alters the otherwise robust chromatin mobility at sites of DNA double-strand breaks (DSBs) in human cells. *PLoS One* **9**, e92640 (2014).
- Jakob, B., Splinter, J. & Taucher-Scholz, G. Positional stability of damaged chromatin domains along radiation tracks in mammalian cells. *Radiat. Res.* **171**, 405–418 (2009).
- Kruhlak, M.J. *et al.* Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* **172**, 823–834 (2006).
- Kruhlak, M.J., Celeste, A. & Nussenzweig, A. Spatio-temporal dynamics of chromatin containing DNA breaks. *Cell Cycle* **5**, 1910–1912 (2006).
- Soutoglou, E. *et al.* Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 675–682 (2007).
- Marnett, A. & Legube, G. Organizing DNA repair in the nucleus: DSBs hit the road. *Curr. Opin. Cell Biol.* **46**, 1–8 (2017).
- Cho, N.W., Dilley, R.L., Lampson, M.A. & Greenberg, R.A. Interchromosomal homology searches drive directional ALT telomere movement and synapsis. *Cell* **159**, 108–121 (2014).
- Caron, P. *et al.* Non-redundant functions of ATM and DNA-PKcs in response to DNA double-strand breaks. *Cell Rep.* **13**, 1598–1609 (2015).
- Roukos, V. *et al.* Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science* **341**, 660–664 (2013).
- Mladenov, E., Magin, S., Soni, A. & Iliakis, G. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin. Cancer Biol.* **37–38**, 51–64 (2016).
- Orthwein, A. *et al.* A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature* **528**, 422–426 (2015).
- Clouaire, T. & Legube, G. DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision? *Nucleus* **6**, 107–113 (2015).
- Aymard, F. *et al.* Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 366–374 (2014).
- Pfister, S.X. *et al.* SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability. *Cell Rep.* **7**, 2006–2018 (2014).
- Carvalho, S. *et al.* SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint. *eLife* **3**, e02482 (2014).
- Daugaard, M. *et al.* LEDGF (p75) promotes DNA-end resection and homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 803–810 (2012).
- Hajjoui, H. *et al.* High-throughput chromatin motion tracking in living yeast reveals the flexibility of the fiber throughout the genome. *Genome Res.* **23**, 1829–1838 (2013).
- Schoenfelder, S. *et al.* The pluripotent regulatory circuitry connecting promoters to their long-range interacting elements. *Genome Res.* **25**, 582–597 (2015).
- Iacovoni, J.S. *et al.* High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* **29**, 1446–1457 (2010).
- Aymard, F. & Legube, G. A TAD closer to ATM. *Mol. Cell. Oncol.* **3**, e1134411 (2016).
- Bolzer, A. *et al.* Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.* **3**, e157 (2005).
- Nagai, S. *et al.* Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase. *Science* **322**, 597–602 (2008).
- Oza, P., Jaspersen, S.L., Miele, A., Dekker, J. & Peterson, C.L. Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes Dev.* **23**, 912–927 (2009).

32. Chiolo, I. *et al.* Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* **144**, 732–744 (2011).
33. Jakob, B. *et al.* DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6489–6499 (2011).
34. Harding, S.M., Boiarsky, J.A. & Greenberg, R.A. ATM dependent silencing links nucleolar chromatin reorganization to DNA damage recognition. *Cell Rep.* **13**, 251–259 (2015).
35. van Sluis, M. & McStay, B. A localized nucleolar DNA damage response facilitates recruitment of the homology-directed repair machinery independent of cell cycle stage. *Genes Dev.* **29**, 1151–1163 (2015).
36. Chailleux, C. *et al.* Quantifying DNA double-strand breaks induced by site-specific endonucleases in living cells by ligation-mediated purification. *Nat. Protoc.* **9**, 517–528 (2014).
37. Crosetto, N. *et al.* Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat. Methods* **10**, 361–365 (2013).
38. Mitra, A., Skrzypczak, M., Ginalski, K. & Rowicka, M. Strategies for achieving high sequencing accuracy for low diversity samples and avoiding sample bleeding using illumina platform. *PLoS One* **10**, e0120520 (2015).
39. Lotterberger, F., Karssemeijer, R.A., Dimitrova, N. & de Lange, T. 53BP1 and the LINC complex promote microtubule-dependent DSB mobility and DNA repair. *Cell* **163**, 880–893 (2015).
40. Belin, B.J., Lee, T. & Mullins, R.D. DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin-2 and Spire-1/2 that promotes efficient DNA repair. *eLife* **4**, e07735 (2015).
41. Lee, C.S., Lee, K., Legube, G. & Haber, J.E. Dynamics of yeast histone H2A and H2B phosphorylation in response to a double-strand break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 103–109 (2014).
42. Chiarle, R. *et al.* Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell* **147**, 107–119 (2011).
43. Klein, I.A. *et al.* Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell* **147**, 95–106 (2011).
44. Wei, P.C. *et al.* Long neural genes harbor recurrent DNA break clusters in neural stem/progenitor cells. *Cell* **164**, 644–655 (2016).
45. Schwer, B. *et al.* Transcription-associated processes cause DNA double-strand breaks and translocations in neural stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 2258–2263 (2016).
46. Tsouroula, K. *et al.* Temporal and spatial uncoupling of DNA double strand break repair pathways within mammalian heterochromatin. *Mol. Cell* **63**, 293–305 (2016).
47. Ginno, P.A., Lim, Y.W., Lott, P.L., Korf, I. & Chédin, F. GC skew at the 5' and 3' ends of human genes links R-loop formation to epigenetic regulation and transcription termination. *Genome Res.* **23**, 1590–1600 (2013).
48. Harrigan, J.A. *et al.* Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *J. Cell Biol.* **193**, 97–108 (2011).
49. Lukas, C. *et al.* 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* **13**, 243–253 (2011).
50. Durkin, S.G. & Glover, T.W. Chromosome fragile sites. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 169–192 (2007).
51. Le Tallec, B. *et al.* Common fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. *Cell Rep.* **4**, 420–428 (2013).
52. Kalocsay, M., Hiller, N.J. & Jentsch, S. Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Mol. Cell* **33**, 335–343 (2009).
53. Ryu, T. *et al.* Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1401–1411 (2015).
54. Matsuoka, S. *et al.* ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**, 1160–1166 (2007).
55. Yamada, K., Ono, M., Perkins, N.D., Rocha, S. & Lamond, A.I. Identification and functional characterization of FMN2, a regulator of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol. Cell* **49**, 922–933 (2013).

ONLINE METHODS

Biotinylated-RNA bait library design. A genomic restriction map was created to generate a list of all HindIII fragments in the genome, and this list was subsequently filtered against 2-Mb regions around the 100 best cleaved AsiSI sites²¹ and three control regions of 2 Mb lacking AsiSI recognition sites (chr 1, 185500000–187500000; chr 17, 70000000–72000000; and chr 5, 111000000–113000000). Probes were designed on every HindIII fragment in a ± 10 -kb region around the AsiSI sites or around the centers of control regions. When two windows of 20 kb overlapped, each probe on the overlapping region was synthesized only once. Over the rest of the 2-Mb window, baits were designed every ten HindIII fragments, i.e. ~ 50 kb. When two 2-Mb windows overlapped, thus leading to a HindIII fragment being captured twice, the fragment just downstream was selected, to capture each fragment only once. For each selected restriction fragment, two 120-bp capture probes were designed, one for each end of the fragment. Because of the size-selection step after sonication, the probes had to fall entirely within a region no more than 500 bp from the end of the fragment. Each probe was required to have no more than three consecutive bases masked by repeat masker, and they had to have a GC content of 25% to 65%, to match the efficient capture range of the SureSelect target-enrichment system (Agilent Technologies). When multiple probes passed these criteria, the probe nearest the end of the restriction fragment was chosen. The full list of HindIII sites near which RNA capture probes were designed is shown in **Supplementary Table 1**. Coordinates and names of captured domains as well as the sizes of the gaps between captured regions are shown in **Supplementary Table 2**.

Capture Hi-C. Generation of a capture Hi-C library was carried out as previously described⁵⁶. Briefly, 30×10^6 cells were fixed in 2% formaldehyde for 10 min. After overnight digestion with HindIII, DNA ends were labeled with biotin-14-dATP by using the Klenow fragment of DNA polymerase I and were religated in preserved nuclei. 50 μ g of DNA was sheared to an average size of 450 bp (Covaris). Sheared DNA was then end-repaired, adenine-tailed and size-selected twice from 250 to 600 bp (AMPure XP beads). Chimeras marked by biotin were pulled down with MyOne Streptavidin C1 DynaBeads (Invitrogen) and ligated to PE adaptors (Illumina). The Hi-C libraries (retained on the beads) were amplified with PE primers (Illumina) with ten PCR amplification cycles. Capture was next carried out on the Hi-C library, with SureSelect target enrichment, with the custom-designed biotinylated-RNA bait library and custom paired-end blockers, according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies). After library enrichment by capture, a postcapture PCR amplification step was carried out with PE PCR 1.0 and PE PCR 2.0 primers, with seven PCR amplification cycles. Capture Hi-C libraries were performed for damaged (4OHT treated) or undamaged (untreated) samples in biological duplicates (i.e., independent experiments) (BR 1 and BR 2) and were sequenced on an Illumina HiSeq 1000 platform. High-throughput sequencing data have been deposited in Array Express under accession number E-MTAB-4846.

Sample sequencing, mapping and quality control. Samples were sequenced with a HiSeq 1000 platform, thus generating 51-bp paired-end reads, at the Babraham Institute in Cambridge. The quality of each raw sequencing file (fastq) was verified with FastQC. After quality control, fastq files were aligned against the reference human genome hg19 with the HiCUP pipeline⁵⁷: this pipeline identifies Hi-C junctions (hicup_truncater) in the fastq file, generates a paired-end read alignment file in .BAM format (hicup_mapper) by mapping each read pair corresponding to a Hi-C ditag (purified Hi-C fragment) and filters out artifactual read pairs (hicup_filter and hicup_deduplicator). The pipeline also provides a report summarizing quality control during the pipeline, including the number of too-short and truncated reads, number of unmapped reads, number of filtered wrong pairs (invalid, same fragment, religation), ditag length and duplication summary (**Supplementary Fig. 1b**). Capture efficiency was shown to be efficient and reproducible for each sample (**Supplementary Fig. 1c,d**).

Interaction counts. Seqmonk (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/>) was used to visualize aligned bam files and to compute the number of interactions among our regions of interest. Briefly, the number of interactions was calculated over the 2-Mb windows, where probes were designed, and around the 100 best cleaved AsiSI sites and three control regions. When sites were less than 1 Mb apart, their 2-Mb regions were merged, thus leading to 88 domains

(85 sites and 3 controls). The number of ditags corresponding to any possible pair of domains was calculated with Seqmonk, and interaction reports containing the 3,228 pairs of domains were used for further visualization and analysis. When indicated (**Fig. 1b** and **Supplementary Fig. 2**), each domain was subdivided into 100-kb windows, thus leading to a Seqmonk interaction report containing the number of interactions among 1,574,425 pairs of subdomains.

R analysis and normalization. Each count matrix was then loaded in R software for further analysis. Manipulation and analyses were performed with the Bioconductor GenomicRanges R package⁵⁸ available from the Bioconductor software project (<http://www.bioconductor.org/>). To compare different samples, the number of interactions was normalized to the total number of aligned read pairs captured on at least one end. The number of interactions between 2-Mb or 100-kb domain pairs was further normalized against the total number of probes used to capture those specific windows, to account for the variation in probe density across each domain. In other words, for each pair of domains (100 kb or 2 Mb), the number of interactions was normalized against the sum of probes designed in each of the two domains.

Differential heat maps of damaged versus undamaged cells. The numbers of interactions for each pair of domains (2 Mb or 100 kb) measured in the +4OHT (damaged) and in -4OHT (undamaged) samples were independently subtracted for both pairs of replicate samples. Differential heat maps were drawn with a natural log (ln) scale (in absolute values, then multiplied by direction of change), as follows: $\text{sign}(+4\text{OHT} - -4\text{OHT}) \times \log[+4\text{OHT} - -4\text{OHT}]$. When indicated, domains were ordered on the basis of RAD51 or γ -H2AX levels (averaged over ± 2 kb or ± 40 kb, respectively), as analyzed by ChIP-seq²¹.

Statistical heat maps. To evaluate the significance of the differences observed between +4OHT and -4OHT, *P* values were computed for each pair of domains, taking into account both replicates, with EdgeR (Empirical analysis of Digital Gene Expression data in R) available through the Bioconductor EdgeR R package⁵⁹. For a symmetrical visualization taking into account the direction of the fold change (in which up and down represent enhanced and decreased interaction levels between samples), *P* values were next transformed as follows: plotted value = $\text{sign}(\log \text{fold change}) \times -\log_{10}(P \text{ value})$, and represented as heat maps. Significant negative changes (decreased interaction after damage) are plotted in blue, whereas significant positive changes (increased interaction after damage) are plotted in yellow. Plotted values were considered statistically significant when the values were > 1.3 and < -1.3 (*P* value ~ 0.05).

Determination of HR-prone and NHEJ-prone DSBs. HR/NHEJ categories were computed on the basis of BLESS data in DivA cells (T. Clouaire, M.A., V.R., A.B., M.S. *et al.*, unpublished data) and ChIP-seq against XRCC4 and Rad51 (ref. 21). Sites were ordered on the basis of their average level of BLESS in a window of 1 kb centered on the AsiSI site. The 80 most cleaved sites were selected. A ratio between the level of RAD51 in a 4-kb window and the level of XRCC4 in a window of 500 bp around each DSB was computed (as performed in ref. 21). We deemed the 30 sites with the highest ratio to be HR-prone sites and the 30 sites with the lowest ratio to be NHEJ-prone sites.

Average interaction maps. For each 2-Mb domain, vectors containing the number of interactions between pairs of 100-kb windows were generated for each replicate damaged and undamaged sample. A mean vector was computed on the basis of all vectors for all 100 DSBs and the three control regions. EdgeR was then used on these mean vectors to identify significant differences in the number of interactions between pairs of 100-kb windows. The results are shown as heat maps, after *P*-value transformation, as described above.

Circos plots. Circos plots represent interactions between a captured domain and all other domains in the genome. Only significantly increased interactions (EdgeR *P* value < 0.05 ; log fold change > 0) between undamaged and damaged conditions were drawn with the Bioconductor OmicCircos R package⁶⁰. Connecting lines are colored on the basis of the log₂ fold change.

Correlation with RNA pol II and H3K36me3 occupancy. The domains were separated into three equal categories, on the basis of the number of differential

interactions of each domain with the others (low, medium or high clustering ability). Transcriptional activity around AsiSI sites was determined with PolII-S2P and H3K36me3 ChIP-seq average levels from the closest gene (from -500 bp from the TSS to the TTS) neighboring each AsiSI site²¹.

Cell lines and cell culture. DivA (AsiSI-ER-U20S) and AID-DivA (AID-AsiSI-ER-U20S) cells were previously developed^{21,27} with U2-OS from ATCC. They were cultured in DMEM supplemented with antibiotics, 10% FCS (Invitrogen) and either 1 µg/mL puromycin (DivA cells) or 800 µg/mL G418 (AID-DivA cells) at 37 °C under a humidified atmosphere with 5% CO₂. The cell lines were regularly tested for mycoplasma contamination.

Treatment and siRNA transfection. For AsiSI-dependent DSB induction, cells were treated with 300 nM 4OHT (Sigma, H7904) for 4 h. For transcriptional inhibition, cells were pretreated with DRB (20 µM or 100 µM, as indicated) for 1 h, which was left on the cells during a subsequent 4-h treatment with 4OHT (Supplementary Fig. 8d). For cell synchronization in G1, cells were incubated with 2 mM thymidine for 16 h, released for 14 h and subjected to the second thymidine treatment for 19 h. G1 and G2 cells were treated with 4OHT after 11 h and 4 h, respectively, and fixed 4 h later (Fig. 4b). For BLESS experiments (Fig. 5b), cells were treated with 4OHT (4 h) 12 h after release, then subjected to a 2-h auxin treatment before harvesting. For cell arrest in G1 (Fig. 5a), cells were treated with 40 µM lovastatin for 48 h. siRNA transfections were performed with a Cell Line Nucleofector kit V (Amaxa) according to the manufacturer's instructions or with interferin (PolyPlus). Sequences of siRNAs are shown in Supplementary Table 4. To assess the efficiency of siRNAs, mRNAs were extracted with a Qiagen RNeasy kit (cat. no. 69504) and reverse transcribed with the AMV reverse transcriptase (Promega, M510F). cDNAs were quantified by RT-qPCR (primer sequences in Supplementary Table 3) and normalized to P0 cDNA levels.

Immunofluorescence. Cells grown on glass coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde, and immunofluorescence was carried out according to a standard protocol (described in ref. 27). A mouse monoclonal antibody (Upstate Biotechnology, JBW 301) was used to stain γ-H2AX (antibody validation provided on the manufacturer's website). The secondary antibody was purchased from Molecular Probes (cat. no. A11032). Image acquisition was performed with MetaMorph on a wide-field microscope equipped with a cooled charge-coupled-device camera (CoolSNAP HQ2) with a 100× objective. Deconvolution was performed with the Richardson-Lucy algorithm with total variation (TV) regularization⁶¹. The algorithm was implemented in the image J deconvolution lab software (<http://bigwww.epfl.ch/algorithms/deconvolutionlab/>). For Supplementary Figure 3a, the 3D coordinates and the volume of each focus was obtained with the FociPicker 3D plugin from ImageJ with the following settings: background was set to automatic, the minimum pixel number in the focus was set to 20, and the tolerance varied, depending on the experiment, to detect a similar number of foci (between 100 and 150 per cell). With these positions and an estimation of the 3D coordinates of the cell center, the 3D Euclidian distance to the cell center was computed for each focus within each cell, with the formula:

$$\text{eucDist} = \sqrt{(x_{\text{focus}} - x_{\text{center}})^2 + (y_{\text{focus}} - y_{\text{center}})^2 + (z_{\text{focus}} - z_{\text{center}})^2}$$

and correlated to the volume ($x_{\text{focus}} \times y_{\text{focus}} \times z_{\text{focus}}$) of each focus. Nineteen cells, from three independent experiments, were analyzed.

Repair assay. DivA cells were treated with 4OHT for 4 h to induce damage and were then washed three times in prewarmed PBS and further incubated with 500 µg/mL auxin (Sigma, I5148) to allow repair. Cells were collected by trypsinization at different times after auxin treatment (0 h, 2 h, 8 h and 14 h), and their DNA was then extracted for use in repair assays. The full procedure for the repair assay has previously been described^{21,36}. Briefly, DNA was extracted, ligated to a biotinylated double-stranded oligonucleotide, cohesive with AsiSI sites, and then fragmented by EcoRI digestion at 37 °C for 2 and h. DNA was pulled down with streptavidin beads (Sigma) at 4 °C overnight. Beads were resuspended in 100 µL of water and digested with HindIII at 37 °C for 4 h. After phenol/chloroform purification and precipitation, DNA was resuspended in 100 µL water. The proportion of unrepaired DSBs was then quantified by qPCR (SYBR premix, TaKaRa) in triplicate (primer sequences are provided in Supplementary Table 3).

Direct *in situ* breaks labeling, enrichment on streptavidin and next-generation sequencing (BLESS). After treatment with 4OHT and or auxin in G1 synchronized cells, DSB labeling was carried out with the BLESS method, as previously described³⁷. Briefly, cells were fixed with formaldehyde, lysed and mildly digested with proteinase K at 37 °C to purify intact nuclei, and then DSBs were blunted and 5'-phosphorylated with a Quick Blunting Kit (NEB). Subsequently, a biotinylated proximal linker (Sigma) was ligated to DSBs with T4 ligase (NEB). Next, DNA was extracted by precipitation with isopropanol and was sonicated with a Covaris S220 ultrasonicator to create fragments approximately 400 bp long. Labeled, biotinylated fragments were captured on streptavidin beads (Invitrogen) and ligated to a distal linker (Sigma). The resulting DNA fragments were then linearized by I-SceI (NEB) digestion and amplified by PCR. Libraries were prepared with a TruSeq DNA LT Sample Prep Kit (Illumina), then subjected to 2 × 61-bp and 2 × 70-bp next-generation sequencing on an Illumina HiSeq 2500. Raw data were filtered with a BLESS adaptor to keep only the end proximal to the cut from the paired read. These proximal reads were aligned with bwa-aln, and PCR duplicates were cleaned with samtools. The coverage and the normalization by the total number of reads was then generated with R. For each site, we computed the average level of normalized counts in a window of ±500 bp around sites.

High-throughput microscopy. DivA cells were plated in 96-well plates (2,500 cells per plate) after transfection with siRNAs with a Nucleofector Kit V (Amaxa). 48 h later, cells were treated with 4OHT (300 nM) for 4 h. After fixation, permeabilization and saturation steps, γ-H2AX was stained overnight with a mouse anti-γ-H2AX monoclonal antibody (Millipore, JBW301; validation provided on the manufacturer's website) and the secondary antibody anti-mouse Alexa 647 (Molecular Probes), cat. no. A21235. Nuclei were labeled with Hoechst 33342 (Sigma) at a final concentration of 1 µg/ml for 30 min. Clustering of γ-H2AX foci was further analyzed with an Operetta automated high-content screening microscope (PerkinElmer). For quantitative image analysis, multiple fields per well were acquired with a 40× objective lens to visualize approximately 2,000 cells/well in triplicate. Each picture was analyzed with the integrated software Harmony. Briefly, the Hoechst nuclei were selected according to the B method, and appropriate parameters, such as the size and intensity of fluorescent objects, were applied to eliminate false-positive compounds.

Then the Alexa 647-γ-H2AX foci were detected with the D method with the following parameters: detection sensitivity, 1; splitting coefficient, 1; background correction, >0.5 to 0.9. We retained the selection of γ-H2AX focus intensity, focus number and focus area as parameters to measure the variation of clustering for each nucleus in each well. G1 and G2 nuclei were selected on the basis of the Hoechst intensity, after visualization of the Hoechst distribution in all cells.

In each nucleus, and for each condition, the clustering index (Supplementary Figs. 5b and 8b) was calculated by dividing the average focus size by the number of foci. The median clustering index for the entire population of nuclei (at least 1,000 nuclei for each condition) was next calculated. Values for G1 (Supplementary Fig. 5b) or control-siRNA-treated cells (Supplementary Fig. 8b) were next set to 1. A minimum of four independent experiments were performed for each condition, and the average clustering index and s.e.m. were plotted. One-sample *t* tests were performed to assess statistical relevance across all biological replicates.

The scatter plots were drawn with the average focus size and the number of foci for each nucleus. Medians of the focus size and number of foci were used to define subpopulations (gates) corresponding to cluster-positive and cluster-negative cells. Outliers, defined as any point lying outside 1.5× the interquartile range (Q3-Q1), below the first quartile (Q1) or above the third quartile (Q3) in a data set, were excluded from graphical representations and further analysis. The number of nuclei in the top-left gate (cluster-negative) and the bottom-right gate (cluster-positive cells) were then counted, and the proportion of nuclei in these two gates for each condition is indicated in the scatter plot for representative experiments (Figs. 4c and 6a-d and Supplementary Fig. 8). The proportion of cluster-positive cells was calculated for at least three biological replicates in each condition, and the average was plotted together with the s.e.m. (Figs. 4c and 6a-d and Supplementary Fig. 8).

Statistics. For all box-plot representations, outliers were defined as first quartile - (1.5 × (third quartile - first quartile)) and above third quartile + (1.5 × (third quartile - first quartile)). The center line represents the median, box limits represent

the first to third quartiles, whiskers represent the maximum and minimum values without outliers, and points show outliers.

For each figure, statistical hypothesis tests were chosen according to the data distribution. For interaction counts of Hi-C data (**Figs. 1c, 2b,d** and **3a** and **Supplementary Fig. 4a**), the EdgeR method was applied to compute *P* values for the number of Hi-C interactions for each pair of domains. Indeed, EdgeR implements statistical methodology based on the negative binomial distributions, which can be applied to differential signal analysis of genomic data that produce counts. The Fisher test (`var.test` function in R) was also applied to verify the homoscedasticity within groups: BR1 versus BR2 -4OHT, *P* = 0.745; BR1 versus BR2 +4OHT, *P* = 0.969; between-group BR1 -4OHT versus BR1 +4OHT, *P* = 0.694; BR1 -4OHT versus BR2 +4OHT, *P* = 0.666; BR2 -4OHT versus BR1 +4OHT, *P* = .946; and BR2 -4OHT versus BR2 +4OHT, *P* = 0.915. Thus, the variances were homogeneous within and among groups. For **Figures 3b,c** and **5b** and **Supplementary Figures 2d** and **6d** Shapiro-Wilk tests (`shapiro.test` function in R) were applied to each sample to verify whether samples came from a normally distributed population. Because the hypothesis that data are normally distributed was rejected with more than 95% confidence, nonparametric unpaired Mann-Whitney-Wilcoxon

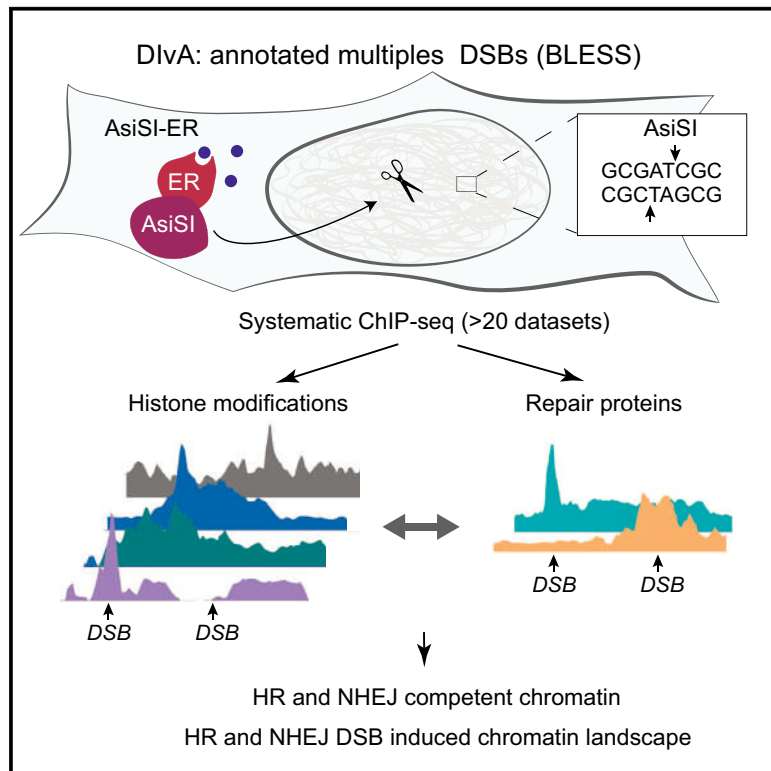
tests (also called Wilcoxon rank-sum tests; `wilcoxon.test` function in R) were applied to test distribution differences between two samples.

Data availability. High-throughput sequencing data have been deposited in Array Express under accession number E-MTAB-4846. Source data for **Figures 3b,c, 4c, 5a,b** and **6a-d** are available with the paper online. Other data and source codes are available upon request.

56. Nagano, T. *et al.* Comparison of Hi-C results using in-solution versus in-nucleus ligation. *Genome Biol.* **16**, 175 (2015).
57. Wingett, S. *et al.* HiCUP: pipeline for mapping and processing Hi-C data. *F1000Res.* **4**, 1310 (2015).
58. Lawrence, M. *et al.* Software for computing and annotating genomic ranges. *PLOS Comput. Biol.* **9**, e1003118 (2013).
59. Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).
60. Hu, Y. *et al.* OmicCircos: a simple-to-use R Package for the circular visualization of multidimensional omics data. *Cancer Inform.* **13**, 13–20 (2014).
61. Dey, N. *et al.* Richardson-Lucy algorithm with total variation regularization for 3D confocal microscope deconvolution. *Microsc. Res. Tech.* **69**, 260–266 (2006).

Comprehensive Mapping of Histone Modifications at DNA Double-Strand Breaks Deciphers Repair Pathway Chromatin Signatures

Graphical Abstract



Authors

Thomas Clouaire, Vincent Rocher, Anahita Lashgari, ..., Krzysztof Ginalski, Jacques Côté, Gaëlle Legube

Correspondence

thomas.clouaire@univ-tlse3.fr (T.C.),
gaelle.legube@univ-tlse3.fr (G.L.)

In Brief

Using ChIP-seq in a cell line where multiple annotated DNA double-strand breaks can be induced on the human genome, Clouaire et al. report a comprehensive view of the chromatin landscape set up at DSBs and decipher the chromatin signature associated with HR and NHEJ repair.

Highlights

- DSB-chromatin landscape and HR/NHEJ chromatin signatures uncovered by ChIP-seq
- H2BK120 undergoes a switch from ubiquitination to acetylation at a local scale
- H1 is removed and ubiquitin accumulates on entire γ H2AX domains, mainly at HR DSB
- 53BP1 spreads over megabase-sized domains, mostly in G1 at HR-prone DSBs



Comprehensive Mapping of Histone Modifications at DNA Double-Strand Breaks Deciphers Repair Pathway Chromatin Signatures

Thomas Clouaire,^{1,*} Vincent Rocher,¹ Anahita Lashgari,² Coline Arnould,¹ Marion Aguirrebengoa,¹ Anna Biernacka,³ Magdalena Skrzypczak,³ François Aymard,¹ Bernard Fongang,⁴ Norbert Dojer,^{4,5} Jason S. Iacovoni,⁶ Maga Rowicka,⁴ Krzysztof Ginalski,³ Jacques Côté,² and Gaëlle Legube^{1,7,8,*}

¹LBCMCP, Centre de Biologie Integrative (CBI), CNRS, Université de Toulouse, UT3, Toulouse 31062, France

²St-Patrick Research Group in Basic Oncology, Laval University Cancer Research Center, Oncology Axis-CHU de Québec-Université Laval Research Center, Quebec City, QC G1R 3S3, Canada

³Laboratory of Bioinformatics and Systems Biology, Centre of New Technologies, University of Warsaw, Zwirki i Wigury Warsaw 93, 02-089, Poland

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555-0615, USA

⁵Institute of Informatics, University of Warsaw, Banacha 2, 02-097 Warsaw, Poland

⁶Bioinformatic Plateau I2MC, INSERM and University of Toulouse, Toulouse 31062, France

⁷Senior author

⁸Lead Contact

*Correspondence: thomas.clouaire@univ-tlse3.fr (T.C.), gaelle.legube@univ-tlse3.fr (G.L.)
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.020>

SUMMARY

Double-strand breaks (DSBs) are extremely detrimental DNA lesions that can lead to cancer-driving mutations and translocations. Non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) represent the two main repair pathways operating in the context of chromatin to ensure genome stability. Despite extensive efforts, our knowledge of DSB-induced chromatin still remains fragmented. Here, we describe the distribution of 20 chromatin features at multiple DSBs spread throughout the human genome using ChIP-seq. We provide the most comprehensive picture of the chromatin landscape set up at DSBs and identify NHEJ- and HR-specific chromatin events. This study revealed the existence of a DSB-induced monoubiquitination-to-acetylation switch on histone H2B lysine 120, likely mediated by the SAGA complex, as well as higher-order signaling at HR-repaired DSBs whereby histone H1 is evicted while ubiquitin and 53BP1 accumulate over the entire γ H2AX domains.

INTRODUCTION

DNA double-strand breaks (DSBs) are extremely detrimental since they can lead to mutations and chromosomal rearrangements. DSBs arise from various environmental stresses and upon developmentally scheduled activation of endonucleases, but they can also arise physiologically during replication and transcription. Anomalies in the DSB repair apparatus are responsible for premature aging and neurodegenerative syn-

dromes and are strongly implicated in cancer onset and progression.

DSBs are mainly repaired by two partially redundant, yet profoundly different, pathways: homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) (for review, see [Mladenov et al., 2016](#)). HR uses an intact copy of the damaged locus as a template and involves many factors for DSB detection, 5' end resection, homology search, strand invasion, and resolution. In contrast, NHEJ repair machineries require no or limited resection and can join the two broken ends with no or minimal homology. Inaccuracy, failure, or misuse of each of these pathways can trigger very different consequences on the genome. DSB repair pathway choice can be influenced by cell cycle phase ([Hustedt and Durocher, 2016](#)), DNA end complexity ([Schipler and Iliakis, 2013](#)), and the type of damaged locus ([Clouaire and Legube, 2015](#); [Engel et al., 2018](#)).

In eukaryotes, DSB repair occurs in the context of chromatin. Chromatin is a highly dynamic structure, affected by histone post-translational modifications, DNA methylation, or incorporation of histone variants (for review, see [Soshnev et al., 2016](#); [Talbert and Henikoff, 2017](#)). Chromatin modifications can alter the stability of the histone octamer onto DNA but also be specifically recognized by “reader” modules found in chromosomal proteins as well as subunits of DNA transaction machineries. All together, nucleosome modifications regulate DNA accessibility; the stiffness, flexibility, and mobility of chromatin within the nucleus; and the recruitment of molecular machines ensuring transcription, replication, and repair.

Key aspects in the interplay between DSB repair and chromatin environment have already emerged ([Table S2](#)). H2AX is rapidly phosphorylated by ATM (and named γ H2AX) over several megabases surrounding the break ([Caron et al., 2015](#); [Iacovoni et al., 2010](#); [Rogakou et al., 1998](#); [Savic et al., 2009](#)). In parallel, histone acetyltransferases and deacetylases tightly control acetylation levels of several residues of H3, H4, and H2A ([Dobbin et al.,](#)



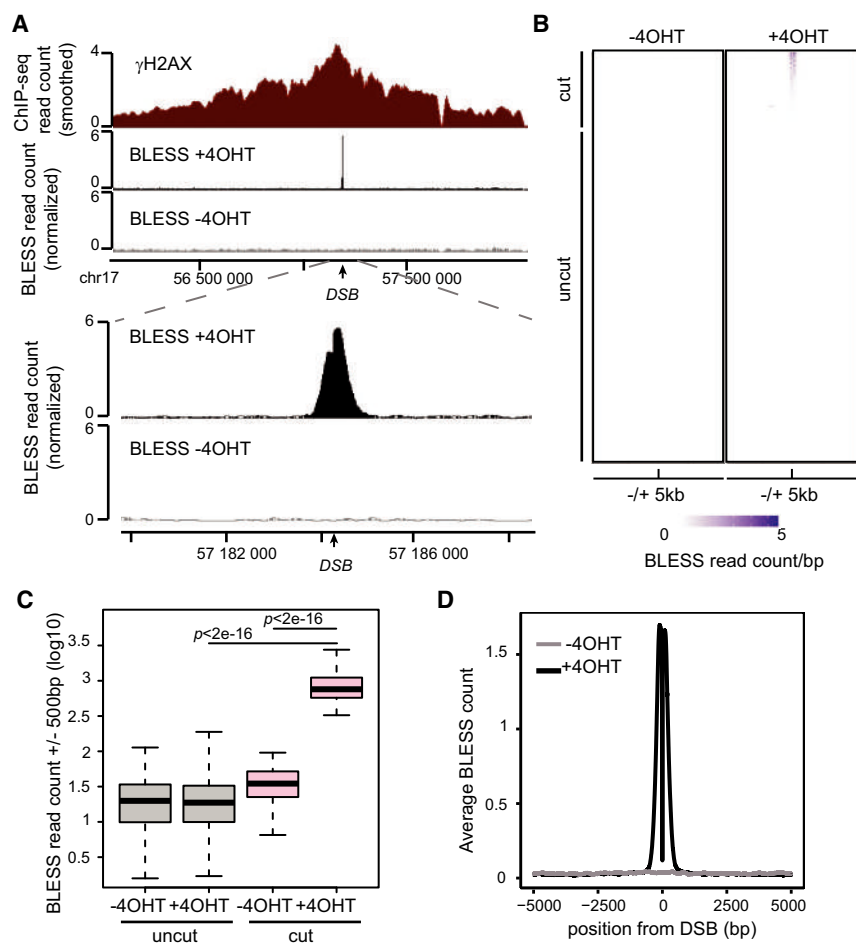


Figure 1. BLESS Mapping of AsiSI-Induced DSB

(A) Genome browser screenshot representing γ H2AX ChIP-seq and BLESS signal at a single DSB located on human chromosome 17.

(B) Heatmap representation of the BLESS profile for the 1,211 predicted AsiSI sites in the human genome in DivA cells untreated (-4OHT) or treated for 4 hr (+4OHT). DSBs are ordered based on decreasing read count in a 1 kb window.

(C) Boxplot representing BLESS signals (1 kb window) for the 80 cut (pink) and the 1,131 uncut (gray) AsiSI sites in untreated (-4OHT) or treated (+4OHT) DivA cells. p values were calculated using two-sample Wilcoxon tests.

(D) Average BLESS count profile for the 80 induced DSBs before (-4OHT, gray line) and after induction (+4OHT, black line).

Here, using high-throughput genomic approaches in a standardized system in which multiple DSBs are induced at defined positions across the human genome, we report the first comprehensive picture of the chromatin landscape induced around DSBs and its relationship with individual repair pathways.

RESULTS

High-Resolution Mapping of AsiSI-Induced DSBs

To characterize the chromatin landscape at DSBs, we used the DivA (DSB inducible

via AsiSI) cell line, which enables the controlled induction (using 4-hydroxytamoxifen, or 4OHT) of multiple well-annotated DSBs scattered throughout the human genome (Aymard et al., 2014; Iacovoni et al., 2010). We previously showed that *in vivo*, AsiSI does not produce a DSB at every target site on the genome and that γ H2AX ChIP-seq can serve as a good proxy to identify sites efficiently cut by AsiSI (Aymard et al., 2014; Iacovoni et al., 2010). However, this is an indirect assessment of the genomic lesion, and γ H2AX accumulation is strongly affected by genomic and epigenomic features (Caron et al., 2012; Iacovoni et al., 2010). To unambiguously identify the position of AsiSI-induced DSBs and obtain a quantitative measurement of the DSB generation rate, we used the recently developed BLESS method (Crosetto et al., 2013; Mitra et al., 2015). We detected sharp BLESS peaks located precisely at predicted AsiSI sites following a 4 hr treatment of DivA cells with 4OHT and minimal signal in untreated conditions (Figures 1A and S1A). Further analysis revealed that out of the 1,211 predicted AsiSI sites in the human genome, 174 showed a signal significantly higher than background (Figures S1B and 1B). This is in relatively good agreement with our previous estimates of the number of induced DSBs inferred from γ H2AX accumulation and with BLISS data in DivA cells (Aymard et al., 2014; Iannelli et al., 2017). However, we could not detect clear

2013; Gong et al., 2015; Jacquet et al., 2016; Lee et al., 2010; Miller et al., 2010; Ogiwara et al., 2011; Toiber et al., 2013) to regulate chromatin relaxation near DSBs. Acetylated histones also participate in the recruitment of nucleosome remodeling factors, enhancing DSB accessibility and facilitating resection (Bennett and Peterson, 2015; Lee et al., 2010; Toiber et al., 2013). Similarly, histone methyltransferases and demethylases can regulate recruitment and/or stabilization of repair proteins (CtIP, 53BP1, BRCA1 ...) (Table S2). Moreover, ubiquitination and sumoylation pathways contribute to DSB-induced chromatin reorganization (for review, see Schwertman et al., 2016). All together, these specific chromatin modifications generate a chromatin state permissive for repair but also directly contribute to the recruitment of DSB repair machineries, repair pathway choice, and the activation of the DNA damage checkpoint.

Yet the definite map of DSB-induced chromatin modifications and their respective involvement in DSB repair remain largely unknown. Furthermore, NHEJ and HR repair pathways conceivably require very different chromatin settings. Since chromatin structure plays a central role in DNA accessibility and flexibility, an in-depth characterization of the chromatin that assembles at DSBs represents a critical step in understanding how DSB repair machineries operate in the whole nucleus to restore the original DNA sequence and avoid deleterious genome rearrangements.

2013; Gong et al., 2015; Jacquet et al., 2016; Lee et al., 2010; Miller et al., 2010; Ogiwara et al., 2011; Toiber et al., 2013) to regulate chromatin relaxation near DSBs. Acetylated histones also participate in the recruitment of nucleosome remodeling factors, enhancing DSB accessibility and facilitating resection (Bennett and Peterson, 2015; Lee et al., 2010; Toiber et al., 2013). Similarly, histone methyltransferases and demethylases can regulate recruitment and/or stabilization of repair proteins (CtIP, 53BP1, BRCA1 ...) (Table S2). Moreover, ubiquitination and sumoylation pathways contribute to DSB-induced chromatin reorganization (for review, see Schwertman et al., 2016). All together, these specific chromatin modifications generate a chromatin state permissive for repair but also directly contribute to the recruitment of DSB repair machineries, repair pathway choice, and the activation of the DNA damage checkpoint.

Yet the definite map of DSB-induced chromatin modifications and their respective involvement in DSB repair remain largely unknown. Furthermore, NHEJ and HR repair pathways conceivably require very different chromatin settings. Since chromatin structure plays a central role in DNA accessibility and flexibility, an in-depth characterization of the chromatin that assembles at DSBs represents a critical step in understanding how DSB repair machineries operate in the whole nucleus to restore the original DNA sequence and avoid deleterious genome rearrangements.

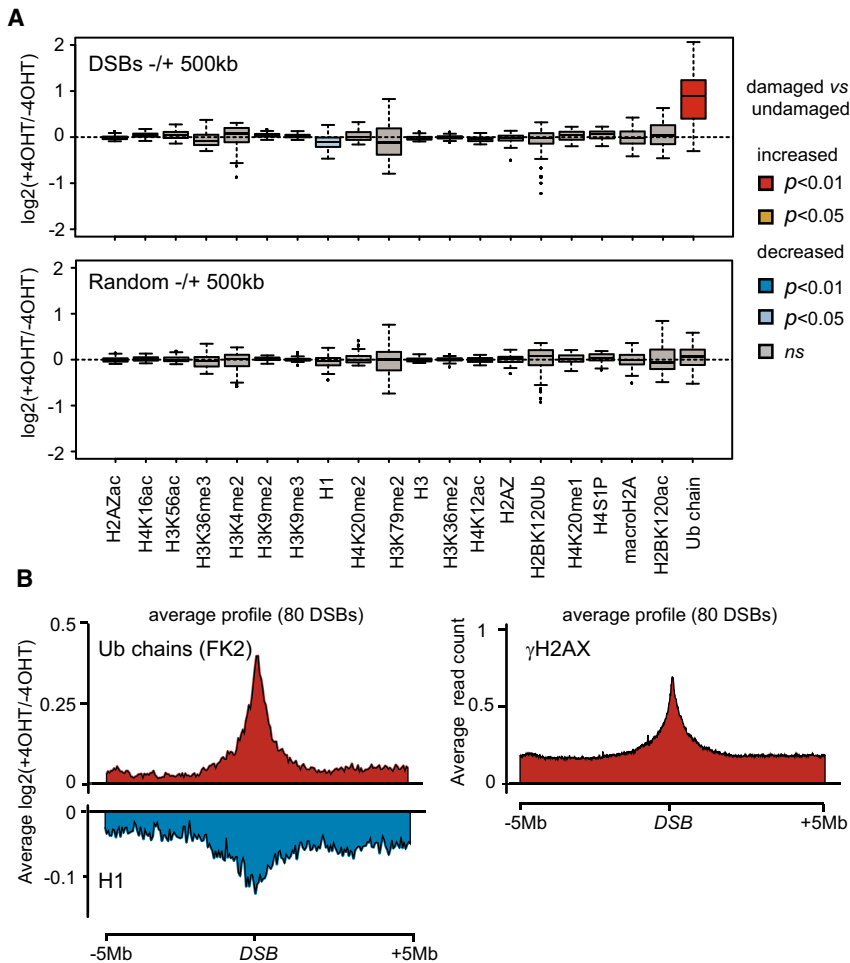


Figure 2. Large-Scale DSB-Induced Chromatin Changes

(A) Boxplot representing the ChIP-seq enrichment ratio between 4OHT-treated and untreated DivA cells (expressed as a log₂ ratio) for 80 DSBs (upper panel) or 80 randomly picked genomic regions (lower panel) over a 1 Mb window. Boxes are colored according to p values (two-sample Wilcoxon tests) and the nature of the change.

(B) Left: Average profile of the enrichment between 4OHT-treated and untreated DivA cells for ubiquitin and H1 over 80 DSBs in a 10 Mb window. Values are expressed as log₂ ratios. Right: Average profile of γH2AX in 4OHT-treated DivA cells.

(Table S2). We also generated a genome-wide map for chromatin-associated ubiquitin using the FK2 antibody that recognizes a wide variety of ubiquitin conjugates. ChIP-qPCR revealed that each antibody efficiently immunoprecipitated chromatin (Figure S2A). More importantly, we could recapitulate previously reported profiles for each feature over transcription units, categorized by transcriptional activity (Figure S2B). Our H4S1P mapping, which was lacking in mammalian cells, is in agreement with its proposed function in transcriptional regulation and accumulation over gene bodies in yeast (Utley et al., 2005).

Given that γH2AX accumulation can spread up to two megabases (Mb) from the actual breakpoint (Iacovoni et al., 2010), we first examined DSB-induced

differences between γH2AX and BLESS signals, confirming that γH2AX does not strictly reflect DSB induction rate (Figure S1A, compare left and right panel; Figure S1C). To remove any site that may only be partially cleaved, we focused on a robust set of 80 DSBs defined by BLESS analysis that are significantly induced by 4OHT treatment (Figures 1B–1D, Table S1). These DSBs are characterized by low levels in heterochromatin-associated features such as DNA methylation and H3K9me3 (Figure S1D), and about half are located near active promoters (Figure S1E). Yet analyzing ChIP-seq enrichment for the elongating form of RNA polymerase II (S2P) revealed that not all sites necessarily reside within actively transcribed regions (Figure S1D). We retained this validated set of DSBs, representing both active and inactive euchromatic regions, for further analysis.

Mapping of Histone Modifications at AsiSI-Induced DSBs

To obtain a comprehensive picture of the chromatin landscape at DSBs, we generated 20 ChIP-seq profiles, in both damaged (4OHT-treated) and undamaged cells. These included linker and core histones, histone variants, and post-translational modifications that were proposed to play a role in DSB repair

chromatin modifications over a 1 Mb window. At this scale, ubiquitination is largely induced ($p < 0.01$, two-sample Wilcoxon test) and histone H1 occupancy significantly reduced ($p < 0.05$, two-sample Wilcoxon test) compared to randomly selected genomic regions (Figure 2A). We could not detect significant DSB-induced changes for any other histone modifications within these megabase-sized genomic windows surrounding breaks. Average profiles revealed that ubiquitin conjugates accumulated over approximately 2 Mb, similarly to γH2AX spreading (Figures 2B and S2C). DSB-induced H1 depletion is maximal over a similar region but remains detectable over a slightly more extended area (Figure 2B, bottom panel, and Figure S2C). All together, this shows that DSBs induce few but large-scale (megabase-sized) chromatin reshufflings, such as phosphorylation of H2AX, accumulation of ubiquitin, and depletion of the linker histone H1.

We next considered that DSB could cause chromatin modifications much closer to the break and examined 1 kb windows surrounding AsiSI-induced DSBs. Interestingly, we found that among the 20 chromatin modifications analyzed, 6 were significantly decreased (H3K79me2, H3, H3K36me2, H4K12ac, H2AZ, and H2BK120ub) and 5 significantly increased (H4S1P,

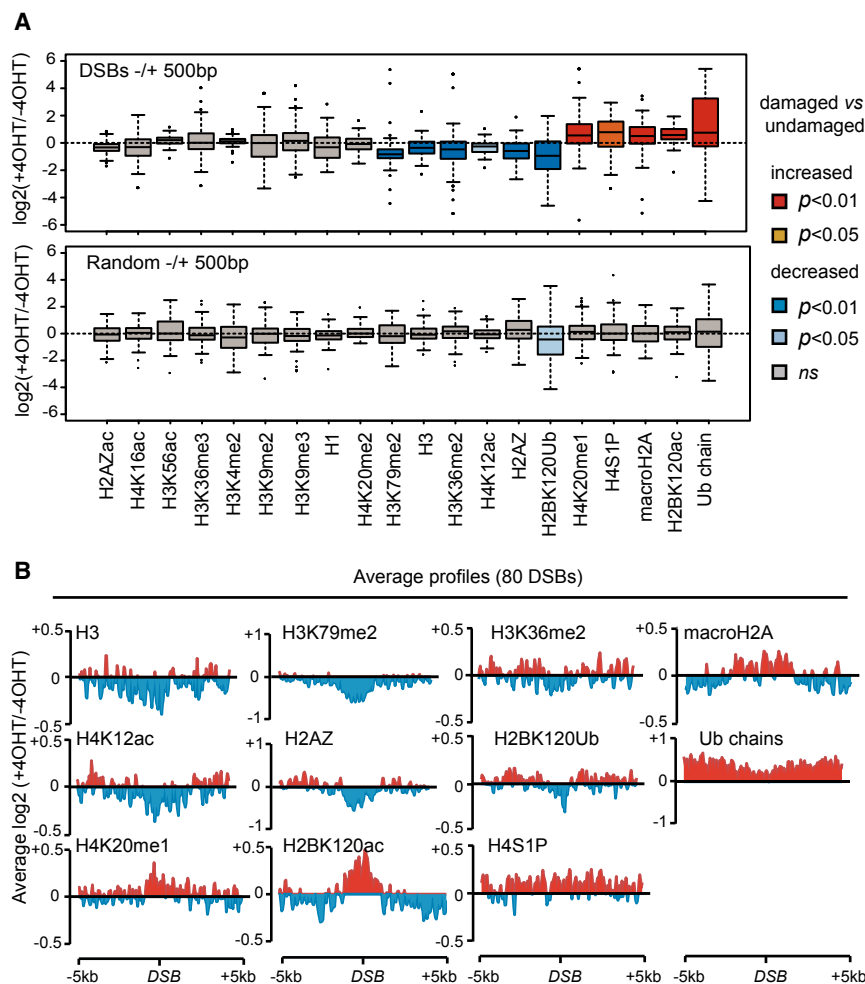


Figure 3. Narrow-Scale DSB-Induced Chromatin Changes

(A) Boxplot representing the ChIP-seq enrichment ratio between treated and untreated DlvA cells (expressed as a log₂ ratio) for 80 DSBs (upper panel) or 80 randomly picked genomic regions (lower panel) over a 1 kb window. Boxes are colored according to p values (two-sample Wilcoxon tests) and the nature of the change.

(B) Average profile of the enrichment between treated and untreated DlvA cells for 12 modifications, showing significant differences between each condition over 80 DSBs in a 10 kb window. Values are expressed as log₂ ratios.

H4K20me1, macroH2A, H2BK120ac, and ubiquitin) near DSBs (Figure 3A, top panel) when compared to random sites (Figure 3A, bottom panel). Average profiles showed that these proximal DSB-induced chromatin alterations spread over different scales, ranging from 1 to 10 kb (Figure 3B). Decreases in H3, H2AZ, H4K12ac, H2BK120ub, and H3K79me2 and the increases in H4K20me1 and H2BK120ac took place over 2–4 kb windows. MacroH2A and H4S1P showed a DSB induction spanning 5–6 kb and approximately 10 kb, respectively. In most cases, normalizing to histone H3 did not alter the observed changes, with the exception of H4K12ac and H3K36me2, which may thus only reflect changes in nucleosome occupancy (Figure S2D). All together, our systematic ChIP-seq mapping indicates that DSBs trigger many alterations to chromatin structure occurring over many different scales, ranging from 1 kb up to several megabases.

More specifically, our data suggest that in response to DSBs, H2BK120 undergoes a switch from ubiquitination to acetylation (Figure 3A). Time-course experiments confirmed the progressive loss of H2BK120ub upon DSB induction (Figure S3A). Interestingly, SAGA, a prominent chromatin-modifying complex, acetylates histones H3 and H2B and also displays

and S3G), indicating that SAGA indeed contributes to DSB repair in human cells.

Damage in Active Chromatin Undergoes Preferential Repair via HR

It is now well established that the local chromatin structure can influence how a given DSB is handled and subsequently repaired (for review, see Clouaire and Legube, 2015). We thus set out to understand the contribution of chromatin to repair pathway choice by defining chromatin states favorable to HR and NHEJ. We defined subsets of BLESS-validated DSBs that are preferentially repaired by HR or NHEJ (30 in each category) by sorting them according to the binding ratio for RAD51 and XRCC4 using ChIP-seq data obtained in 4OHT-treated DlvA cells (Aymard et al., 2014). Average profiles confirmed the prominent accumulation and spreading of RAD51 over 5 kb at DSBs preferentially repaired by HR (Figure 4A). On the other hand, XRCC4 recruitment appeared similar for both sets of DSBs, with a multimodal distribution over 500 bp (Figures 4A and S4A), likely related to XRCC4/XLF filaments at DSBs (Ropars et al., 2011). Importantly, BLESS intensity was comparable between HR and NHEJ DSBs (Figures 4A and 4B), suggesting

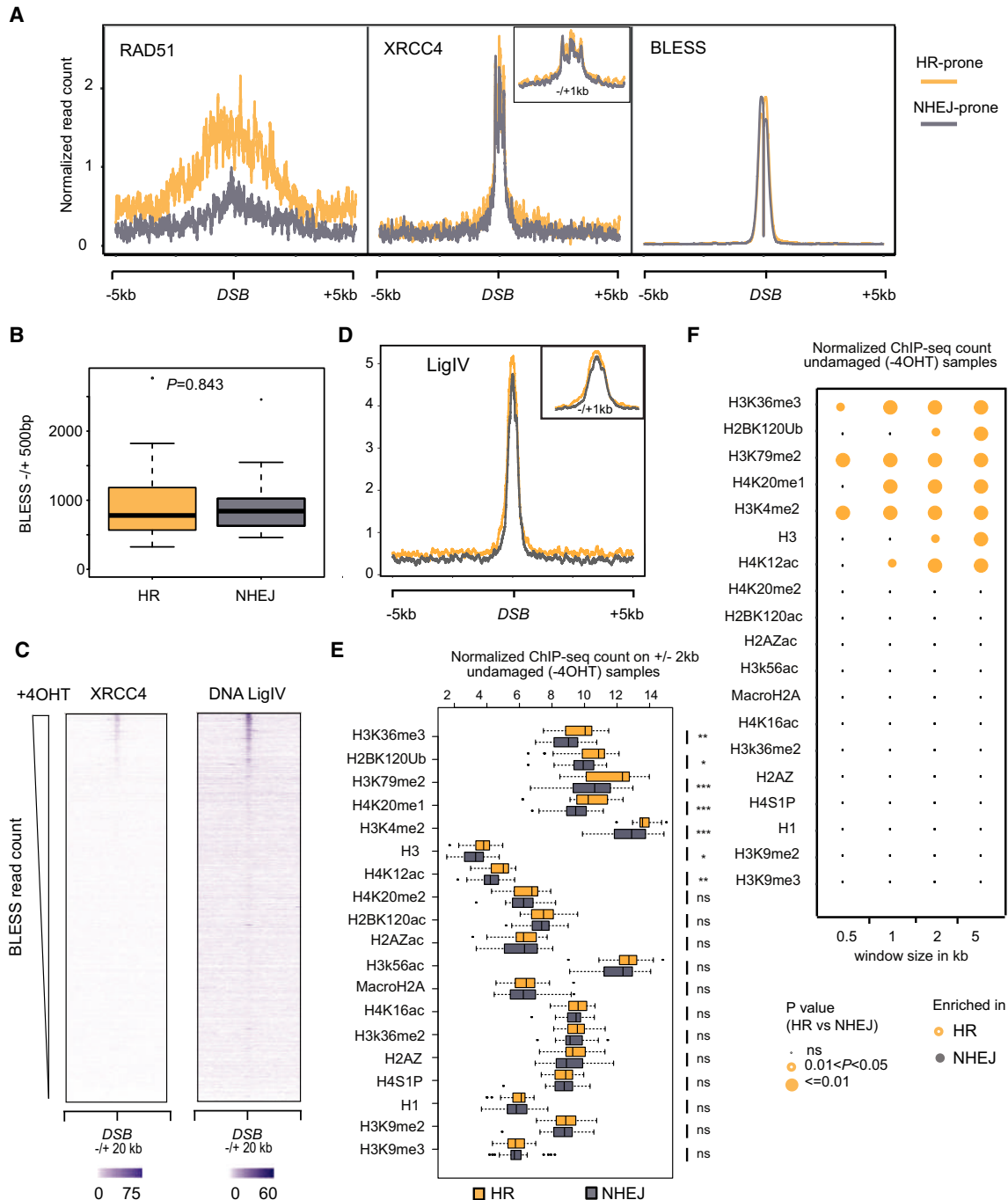


Figure 4. Chromatin Features Associated with HR-Prone DSBs

(A) Average profile for RAD51 ChIP-seq, XRCC4 ChIP-seq, and BLESS for 30 HR (yellow) or 30 NHEJ (gray) DSBs. HR and NHEJ DSBs were defined based upon the RAD51/XRCC4 binding ratio (see STAR Methods).

(B) Boxplot representing BLESS read count (1 kb window) around 30 HR or 30 NHEJ DSBs. p value was calculated using two-sample Wilcoxon test.

(C) Heatmap representing the XRCC4 and DNA Ligase IV ChIP-seq signals on a 40 kb window centered around all AsiSI sites, ordered based on the BLESS level.

(D) Same as (A) for DNA Ligase IV ChIP-seq.

(E) Boxplot representing the ChIP-seq read count (4 kb window) for each histone modification in untreated cells for 30 HR (yellow) and 30 NHEJ (gray) DSBs. p values were calculated using two-sample Wilcoxon test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $p > 0.05$ is not significant (ns).

(F) Circle plot representing p values (from two-sample Wilcoxon test) when comparing ChIP-seq signal for HR and NHEJ DSB using increasing window size.

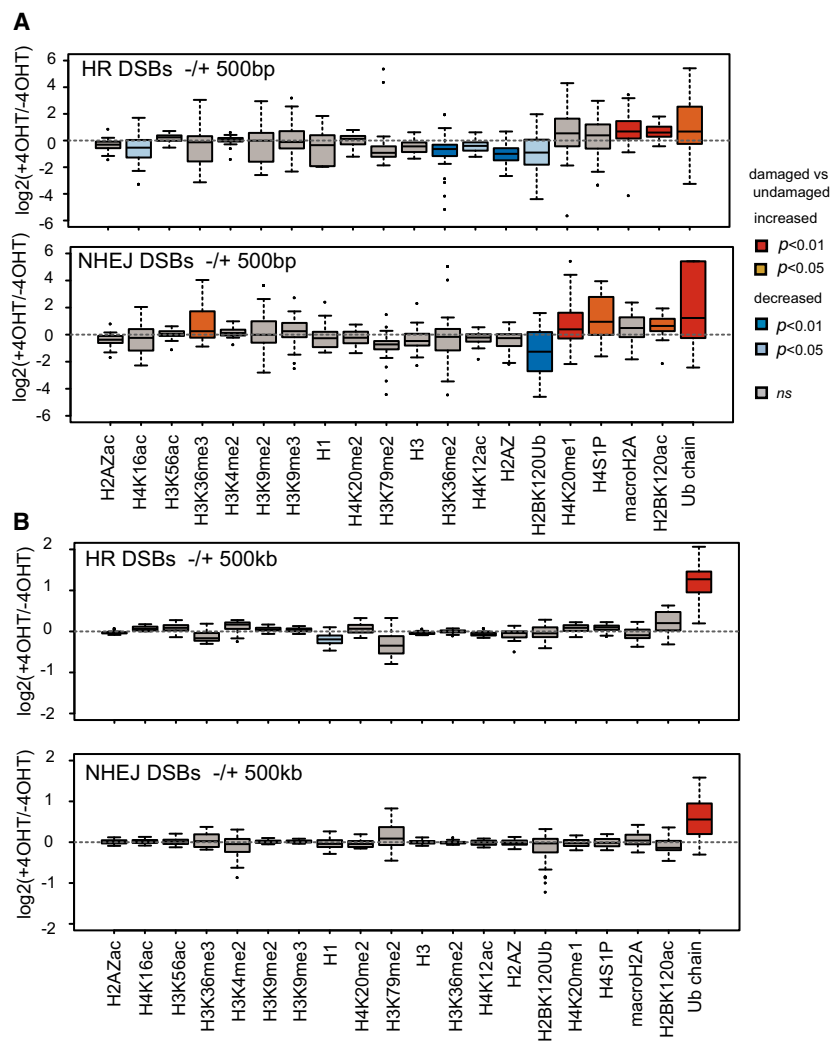


Figure 5. HR and NHEJ-Induced Chromatin Changes

(A) Boxplot representing the ChIP-seq enrichment ratio between treated and untreated DivA cells (expressed as a log₂ ratio) for 30 HR (upper panel) or 30 NHEJ (lower panel) over a 1 kb window. Boxes are colored according to p values (two-sample Wilcoxon tests) and the nature of the change.

(B) Same as (A) for a 1 Mb window.

repaired by HR or NHEJ. In agreement with our previous finding (Aymard et al., 2014), H3K36me3 was significantly more abundant proximal to DSBs repaired by HR (Figure 4E). HR-competent chromatin also contained elevated levels of H3K79me2, H4K20me1, H2BK120ub, H3K4me2, H4K12ac, and core histone H3 (Figure 4E). This result was confirmed when comparing chromatin signatures over increasing window sizes (Figure 4F). Consistently, we found a similar trend when using DNA ligase IV instead of XRCC4 to determine HR and NHEJ categories (Figure S5D). On the other hand, we found no evidence of a specific signature that may actively favor repair by NHEJ (Figures 4E, 4F, and S5D). All together, these data identified a specific chromatin structure that is competent for HR repair. The HR-specific signature primarily consists of features linked to active transcription (Figure S2B). In agreement, HR-prone DSBs were found to be significantly enriched in the nuclear compartment A1, which was defined by its specific long-range interaction pattern by Hi-C analysis and shown to be enriched in transcriptionally active regions (Rao et al., 2014) (Figure S4B). Hence, our data strongly favor the hypothesis that DSBs induced in active genes are biased toward HR.

that differences in RAD51 binding do not solely depend on the DSB induction rate. Since NHEJ is a relatively fast process compared to HR, it remained possible that some sites could be cleaved, repaired, and mutated with a very fast kinetics, therefore not appearing in our set of NHEJ-prone DSBs. To address this, we performed XRCC4 ChIP-seq at various times of 4OHT treatment (1 hr, 4 hr, and 24 hr) and found that XRCC4 binding was indeed very similar at DSB sites at each time point (Figures S4C–S4E). More importantly, we could not detect any site showing XRCC4 enrichment at 1 hr or 24 hr and not at 4 hr, which strongly validated our HR and NHEJ categories (Figures S4C–S4E). To confirm that XRCC4 binding was indeed indicative of NHEJ, we also performed ChIP-seq using an antibody directed against DNA ligase IV, another key component in this pathway. As expected, DNA ligase IV showed a very similar enrichment when compared to XRCC4 at all AsiSI sites (Figures 4C, 4D, and S5A–S5C). All together, these analyses allowed us to define a robust set of DSBs either prone to engage HR (HR-prone) or not (NHEJ-prone).

Next, we compared basal enrichment (before DSB induction) for each modification at the vicinity of DSBs (2 kb) preferentially

Chromatin Modifications upon HR and NHEJ Repair: Deciphering the Repair Pathway Chromatin Signature

DSB repair by HR and NHEJ depends on two separate mechanisms and operates in distinct chromatin contexts (see above). Hence, it is possible that each pathway involves different remodeling events compatible with its particular repair mechanism. We therefore considered the possibility that DSB-induced alterations in chromatin could be specific for HR- and NHEJ-prone DSBs. Notably, focusing on events occurring proximal to the break point (1 kb windows), we found that while some chromatin marks significantly changed after break induction only at DSBs repaired by HR or by NHEJ, others occurred irrespective of the repair mechanism (Figure 5A). We also examined DSB-induced chromatin changes at HR- and NHEJ-prone sites at various distances from the DSBs (Figure S5E). MacroH2A deposition and H4S1 phosphorylation occurred upon repair by both HR and NHEJ (Figures 5A and S5E). Similarly, the switch from

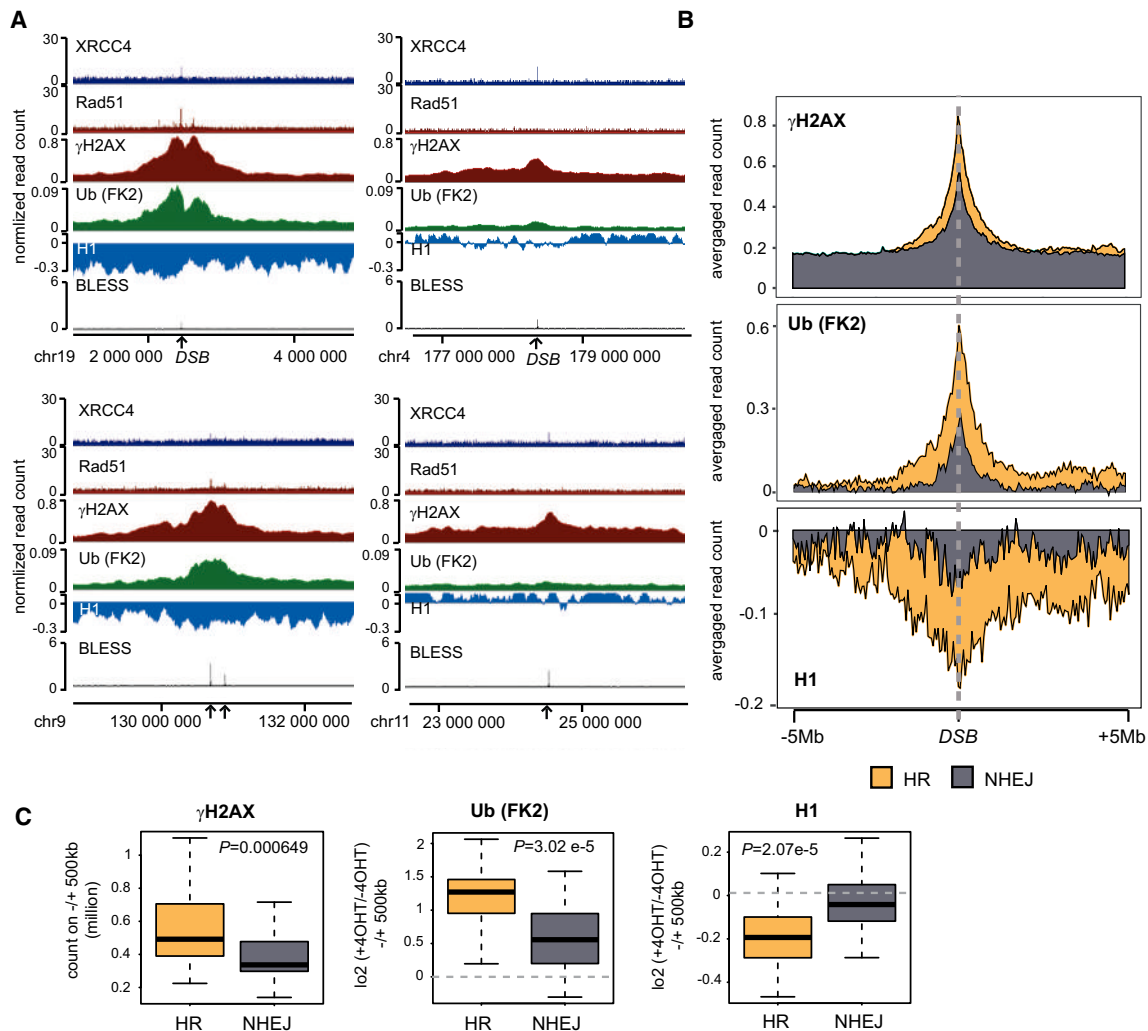


Figure 6. Acute Signaling at HR-Prone DSBs

(A) Genome Browser screenshots representing ChIP-seq signals for XRCC4, RAD51, γ H2AX, ubiquitin, H1, and BLESS for two HR-DSBs (left) and two NHEJ DSBs (right). Data are expressed as read count (from 4OHT-treated samples) for XRCC4, RAD51, and γ H2AX ChIP-seq and BLESS. Data for ubiquitin (FK2) and H1 are expressed as a \log_2 ratio between treated and untreated cells.

(B) Average profile for γ H2AX ChIP-seq (read count in OHT treated samples), ubiquitin, and H1 (as a \log_2 ratio between treated and untreated cells) for 30 HR (yellow) and 30 NHEJ (gray) DSBs in a 10 Mb window.

(C) Boxplot representing ChIP-seq read count from treated cells (γ H2AX) or \log_2 ratio between treated and untreated cells (ubiquitin [FK2] and H1) for 30 HR (yellow) or 30 NHEJ (gray) DSBs in a 1 Mb window. p values were calculated using two-sample Wilcoxon tests.

H2BK120 ubiquitination to acetylation also occurred at all DSBs (Figures 5A and S5E), in agreement with our above finding that depletion of the SAGA complex affects both HR and NHEJ (Figures S3F and S3G). In contrast, reduction in H2AZ and H3 occupancy and decrease in H3K36/79 dimethylation and in H4K12/K16 acetylation following DSB induction were significant only at sites prone to HR (Figures 5A and S5E). Conversely, DSB induction at sites repaired by NHEJ was accompanied by a significant increase in H3K36me3 and H4K20me1, modifications not found at HR-repaired DSBs (Figures 5A and S5E). Hence, we were able to define a local histone modification signature, which occurs proximal to DSBs, associated with the two main repair pathways.

We also interrogated our data for pathway-specific events occurring within 1 Mb from the break. Linker histone H1 depletion and ubiquitin accumulation were significantly more pronounced within 1 Mb of HR-repaired sites compared to NHEJ-prone DSBs (Figure 5B). Examination of individual (Figure 6A) or averaged (Figure 6B) profiles confirmed that DSB-induced changes in H1 and ubiquitin were accentuated at HR sites, with H1 depletion being barely detectable at NHEJ sites. We also detected increased megabase-wide γ H2AX levels for HR sites compared to NHEJ sites (Figures 6A and 6B). Accumulation of ubiquitin conjugate, H2AX phosphorylation, and H1 depletion were indeed significantly reinforced surrounding DSBs repaired by HR compared to those repaired by NHEJ (Figure 6C). This finding suggests that damage

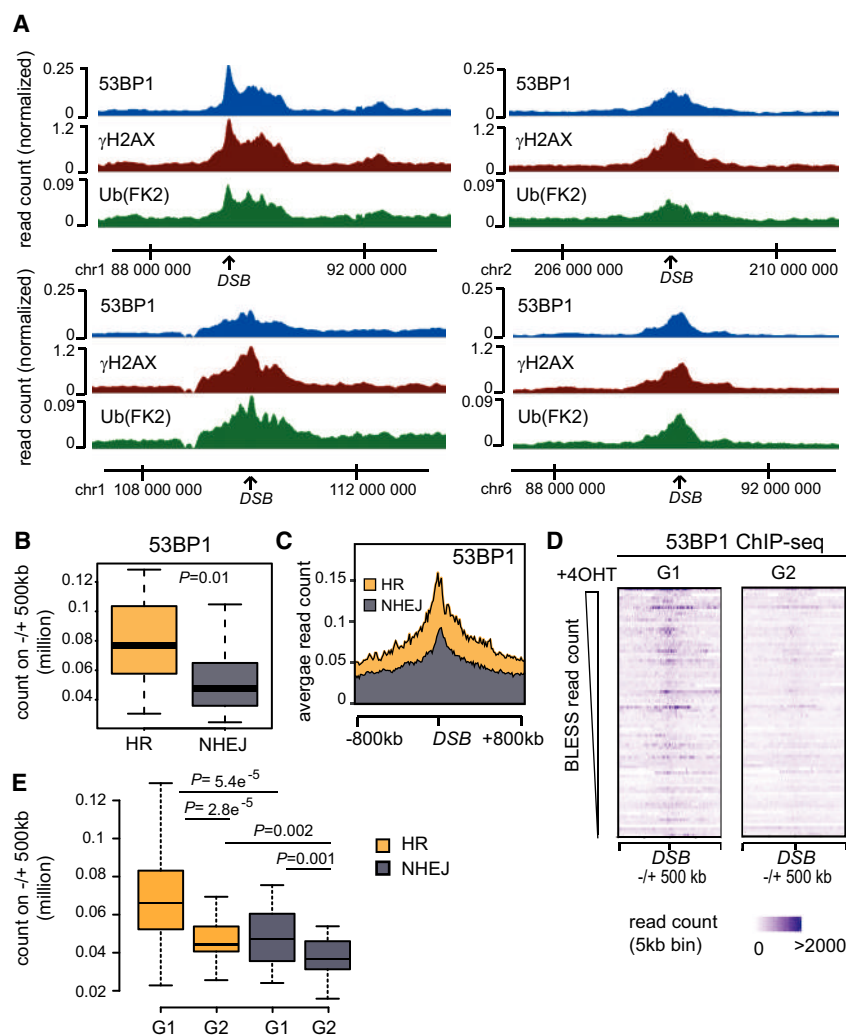


Figure 7. 53BP1 Preferentially Accumulates at HR-Prone DSBs Specifically in G1

(A) Genome Browser screenshots representing ChIP-seq signals (from 4OHT-treated samples) for 53BP1, γ H2AX, and ubiquitin.

(B) Boxplot representing 53BP1 enrichment in a 1 Mb window for 30 HR (yellow) and 30 NHEJ (gray) DSBs. p value was calculated using two-sample Wilcoxon test.

(C) Average profile for 53BP1 ChIP-seq (read count in 4OHT-treated cells) for 30 HR (yellow) and 30 NHEJ (gray) DSBs in a 1.6 Mb window (upper panel).

(D) Heatmap representing 53BP1 ChIP-seq count obtained in G1- and G2-synchronized cells as indicated, on a 1 Mb window surrounding 80 DSBs induced by AsiSI. DSBs are sorted by BLESS read counts.

(E) Boxplot representing 53BP1 enrichment in a 1 Mb window for 30 HR (yellow) and 30 NHEJ (gray) DSBs in G1- and G2-synchronized cells as indicated. p values were calculated using two-sample Wilcoxon test.

the 80 DSBs (Figure S6A) revealed a striking ability for 53BP1 to spread within megabase-wide domains. Furthermore, 53BP1 binding profiles appear almost indistinguishable from those of γ H2AX and ubiquitin (Figures 7A and S6A), and we observed a very strong correlation between the accumulation of γ H2AX, ubiquitin, and 53BP1 within 1 Mb domains surrounding DSBs (Figure S6B). We also observed that 53BP1 is significantly more enriched within a megabase from sites preferentially repaired by HR compared with sites repaired by NHEJ (Figures 7B, 7C, and S6C). Thus, our data suggest that DSBs occurring in active chromatin, which preferentially undergo HR repair, can trigger an acute high-order chromatin signaling that may favor subsequent recruitment of 53BP1 over megabase-sized regions encompassing the break site.

In vivo, 53BP1 was shown to inhibit 5' end resection in various contexts, including class switch recombination and dysfunctional telomeres fusion (for review, see Panier and Boulton, 2014). Yet our results suggest that 53BP1 binding is stronger at sites that are more prone to be repaired by HR, a process that requires end resection. To clarify this apparent discrepancy, we generated 53BP1 ChIP-seq data in damaged G1- and G2-synchronized cells. Overall, we found that 53BP1 accumulation was much stronger during G1 compared to G2, (Figures 7D and S6D–S6F). Because γ H2AX appeared rather similar between both phases of the cell cycle (Figure S6F), this suggests that the striking difference in 53BP1 spreading over megabase-wide domains observed when comparing G1 and G2 cells is unlikely to be due to differences in DSB induction rates. Finally, we confirmed that 53BP1 accumulation is more prominent at DSBs repaired by HR in G1 compared to G2, while signal for NHEJ DSB remained consistently lower regardless of the cell

occurring in active chromatin and repaired by HR can trigger acute and broad-scale remodeling within high-order chromatin structure that is likely to drastically alter its properties.

Acute High-Order Chromatin Modifications Correlate with Enhanced 53BP1 Recruitment *In Vivo*

An obvious role for chromatin-mediated DSB signaling would be to directly attract effectors of the DDR. 53BP1 plays key roles in DSB repair by inhibiting end resection, favoring distal end synapsis, and promoting damaged chromatin mobility (for review, see Panier and Boulton, 2014). 53BP1 interaction with damaged chromatin involves multivalent engagement of several histone modifications such as H2A (or H2AX) lysine 15 ubiquitination and methylation of lysine 20 on histone H4 (Fradet-Turcotte et al., 2013; Wilson et al., 2016). Furthermore, stable 53BP1 association with DSBs may involve a direct interaction with γ H2AX (Kleiner et al., 2015; Ward et al., 2003) and can be regulated by acetylation on H4 and H2A (Jacquet et al., 2016; Tang et al., 2013). We generated a genome-wide ChIP-seq map of 53BP1 binding to damaged chromatin *in vivo*. Inspection of 53BP1 distribution around individual DSBs (Figure 7A) or averaged over

cycle phase (Figure 7E). Thus, our data revealed that 53BP1 binding is favored at HR-prone DSBs, but mostly in G1, when HR usage is restricted. This suggests that 53BP1 exerts its anti-resection function in G1 only at sites prone to undergo HR, while it may be less critical at DSBs usually repaired by NHEJ.

DISCUSSION

A Standardized Approach to Investigate DSB-Induced Chromatin Changes

Here, we provide the most comprehensive view to date of the chromatin landscape assembled at DSBs in human cells. By analyzing 20 chromatin features that were previously shown to be involved in DSB repair, we were able to substantiate several earlier findings such as H3, H2AZ, and H1 removal, macroH2A incorporation, H4S1 phosphorylation, H4K16 deacetylation, H4K20 monomethylation, and the accumulation of ubiquitin conjugates at sites of damage (Table S2). Interestingly, DSB-induced phosphorylation of histone H4 has only been previously reported in budding yeast and was proposed to promote NHEJ (Cheung et al., 2005; Utley et al., 2005). Break-induced H4 phosphorylation is therefore conserved in higher eukaryotes and spreads over large regions spanning up to 10 kb from the DSB, independently of the repair pathway. This ability to propagate up to 50 nucleosomes away from the break suggests that H4 phosphorylation functions in DDR signaling, potentially as a recruitment platform for DDR proteins.

Here we failed to detect any change reported by others (Table S2) in H3K9me2, H3K9me3, H4K20me2, or H3K56ac. Conversely, we observed a clear loss of H3K79me2 and H2BK120ub, two histone modifications that were found, respectively, unchanged and increased at sites of breaks (Huyen et al., 2004; Moyal et al., 2011; Nakamura et al., 2011). Such discrepancies could arise from the use of different DSB induction methods that can produce chemically different DNA ends, concomitantly trigger other forms of DNA damage, or create DSBs at a given cell cycle stage. More importantly, DSB-inducing agents do not necessarily damage the same regions across the genome, which will strongly influence the chromatin outcome. Indeed, X- and γ -rays produce DSBs randomly throughout the genome, mainly in untranscribed and potentially heterochromatic regions, while AsiSI mostly introduces DSBs within or near genes, either active or inactive, leaving heterochromatin undamaged. This could explain why neocarzinostatin and ionizing radiation, unlike AsiSI-induced DSBs, trigger an increase in H2BK120ub levels (Moyal et al., 2011; Nakamura et al., 2011). Kinetic aspects should also be considered. We performed our ChIP 4 hr after AsiSI activation, a time point representing an “equilibrium” in which events ranging from early cleavage to late repair cohabit within the cell population. However, this may preclude the identification of very transient and/or very late events. Finally, in order to identify the most prominent DSB-induced chromatin features, we purposely limited our large-scale analysis to an averaged snapshot on a large population of asynchronous cells, which may hinder the identification of events occurring at specific cell cycle stages. Yet despite a few discrepancies with the published literature, our study allowed us to

highlight major chromatin changes during DSB repair and to associate these changes with a preferred repair pathway. Additional studies in repair-deficient cells should now be conducted in order to establish whether these histone modification changes do indeed depend on HR or NHEJ repair or only on the initial chromatin status. Moreover, systematic mapping of chromatin-modifying enzymes following DNA damage will be required to better understand the establishment of this multiscale chromatin landscape. Investigating if, when, and how this DSB-induced chromatin landscape is reverted following repair in order to maintain epigenome stability also represent exciting follow-up studies.

Histone Crosstalks Involved in Transcription Regulation Are Mobilized in the DSB Response

Importantly, our data fully recapitulate several crosstalks previously identified in the context of chromatin organization and transcriptional regulation. Indeed, our study reveals that upon DSB induction, macroH2A is incorporated (Khurana et al., 2014), and H2BK120 undergoes a switch from ubiquitination to acetylation. MacroH2A can regulate gene expression by stimulating CBP-dependent H2BK120 acetylation (Chen et al., 2014), which precludes H2BK120 ubiquitination. Our findings suggest that this macroH2A-H2BK120ac crosstalk goes beyond transcriptional regulation and may also function following DNA damage and repair. Our work revealed that the transition from ubiquitination to acetylation on H2BK120 may be mediated by the SAGA complex, a well-known complex involved in transcriptional regulation, and that depletion of DUB and HAT subunits of SAGA leads to defective HR and NHEJ, in agreement with a previous study (Ramachandran et al., 2016). Notably, these macroH2A-H2BK120 changes occur independently of the DSB considered (i.e., prone to be repaired by HR or NHEJ), suggesting that they take place before repair reaction is engaged. Given the function of H2BK120ub in nucleosome stabilization (Batta et al., 2011; Fleming et al., 2008), deubiquitinating H2B may loosen nucleosome stability onto DNA, thereby favoring subsequent remodeling and downstream repair events.

We also identified seven additional chromatin changes after DSB induction, including decreases in H3K79me2, H2AZ, and H4K12/K16ac, which specifically occurred at DSBs prone to HR (Figure S7). We also recently demonstrated that H3K4me3 decreases at AsiSI-induced DSBs (Gong et al., 2017). Notably, all these modifications were already found to be coordinated and linked to H2B ubiquitination during transcriptional regulation. For example, H2BK120ub is required for H3K79 methylation (McGinty et al., 2008; Sun and Allis, 2002) and counteracts INO80-dependent H2AZ removal (Segala et al., 2016). Finally, H2B ubiquitination stimulates H3K4 trimethylation (Sun and Allis, 2002; Zhu et al., 2005). Our data indicate that this well-established crosstalk likely also functions at DSBs and that the switch from H2BK120 ubiquitination to acetylation at DSBs may subsequently induce H3K79 and H3K4me3 demethylation, H4 deacetylation, and H2AZ removal by INO80, which itself associates with DSB (Downs et al., 2004; Morrison et al., 2004; van Attikum et al., 2004). Since H2AZ occupancy was found to regulate end resection (Alatwi and Downs, 2015; Gursoy-Yuzugullu et al., 2015; Xu et al., 2012), it is possible that these coordinated

modifications of H2BK120ub-H3K79me2-H2AZ-H4 at HR-prone DSBs contribute to the establishment of a chromatin state competent for resection and/or Rad51 nucleofilament assembly.

Megabase-Scale Chromatin Signaling: A Central Unit in the DSB Response

Chromatin flanking DSBs also undergoes extensive large-scale remodeling, such as γ H2AX spreading over megabase-wide domains (Iacovoni et al., 2010; Rogakou et al., 1998; Savic et al., 2009). Here we show that this large-scale remodeling is also accompanied by the accumulation of ubiquitin conjugates, 53BP1 accrual, and the removal of histone H1 from the entire γ H2AX domain. 53BP1 is known to be recruited to damaged chromatin by engaging multiple interactions with H2AK15ub and H4K20me2 but also with γ H2AX (for review, see Panier and Boulton, 2014). Our data support this proposed mode of recruitment given that: (1) 53BP1 strongly parallels the pattern observed with γ H2AX and the FK2 antibody (although the broad specificity of this antibody toward many ubiquitinated substrates precludes a definitive conclusion regarding the nature of the modified protein) and (2) 53BP1 association with DSB is minimal in G2, in agreement with the proposed dilution of H4K20me2 on post-replicative chromatin (Pellegrino et al., 2017). H1, on the other hand, was recently shown to be displaced from sites of DNA damage (Sellou et al., 2016; Strickfaden et al., 2016). Interestingly, RNF8-mediated H1 ubiquitination loosens its interaction with chromatin (Thorslund et al., 2015), providing potential mechanisms for H1 eviction from megabase-wide γ H2AX domains. These megabase-wide chromatin modules display well-defined boundaries that may correlate with topologically associated domains (TADs) (Caron et al., 2012; Marnef and Legube, 2017), a basic unit of chromosome folding in 3D. The establishment of these large chromatin changes might therefore be determined by the initial chromosome structure (for review, see Aymard and Legube, 2016; Marnef and Legube, 2017). Such profound changes in entire TADs could regulate the chromatin fiber physical properties such as the mobility of the damaged DNA within the nucleus. In agreement, linker histones strongly affect the global chromatin structure (Fan et al., 2005), and 53BP1 favors long-range motions of DNA ends (Dimitrova et al., 2008).

The Complex Fate of DSBs in Active Transcription Units

DSB repair varies across the genome. Damage in heterochromatin is largely repaired by HR in G2 by a specific pathway requiring 53BP1-dependent chromatin relaxation, followed by its relocation at the periphery of IR-induced foci (Kakarougkas et al., 2013; Noon et al., 2010). In euchromatin, only transcriptionally active genes, when damaged, are prone to HR repair in G2 (Aymard et al., 2014; this study). Importantly, damaged active genes are refractory to repair in G1, where they instead persist and cluster together within foci (Aymard et al., 2017). Here we found that megabase-size chromatin modifications are more prominent at sites prone to be repaired by HR, e.g., DSBs occurring within active chromatin domains. Such an acute signaling could be indicative of a specific DDR pathway mobilized upon damage in active regions of the genome. Additionally, we found that these DSBs also display enhanced binding of 53BP1, specifically during G1. We did not observe specific 53BP1 accumu-

lation or redistribution at HR-prone DSBs during G2 in our study, suggesting that 53BP1 is likely dispensable to promote HR in the euchromatic, relaxed fraction of the genome. 53BP1 may interact with DSBs to inhibit extensive end processing in G1 and avoid the use of deleterious pathways such as alt-NHEJ during times when canonical HR is not available (Biehs et al., 2017).

In summary, we provide here the first comprehensive depiction of the set of histone modifications induced upon DSB associating with HR and NHEJ repair and report a thorough description of HR-competent chromatin, which is strongly linked with transcriptional activity. Active genes emerge as particularly fragile loci that frequently experience DNA double-strand breakage (for review, see Marnef et al., 2017) and represent translocation hotspots. Characterizing the local and large-scale chromatin structures that assemble at these specific damaged loci represents the first step to understanding how chromatin mobility may change following damage to promote DSB clustering and homology search and, in some instance, lead to translocations.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Chemicals
 - Cell Culture and Cell Lines
- METHOD DETAILS
 - Cell treatments
 - Establishment of cell line expressing SUPT7L from the AAVS1 safe harbor and TAP Purification of native human SAGA HAT/DUB complex
 - *In vitro* histone acetylation assay
 - *In vitro* histone de-ubiquitination assay
 - RT-qPCR
 - Cas9/mClover-LMNA1 homologous recombination assay
 - NHEJ assay
 - Cell cycle analysis
 - ChIP
 - BLESS
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
 - ChIP-seq data processing
 - BLESS data processing
 - Descriptive statistics using box-plot representation
 - Statistical analysis and representations
 - Averaged ChIP-seq profiles
 - Generation of random positions
 - Determination of HR-prone and NHEJ-prone DSBs
- DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures and two tables and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.020>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the GeneCore facility of EMBL for high-throughput sequencing. We thank K.M. Miller (University of Texas) for critical reading of the manuscript and J.-Y. Masson/G. Dellaire for reagents and advice for the Clover/HR assay. Funding was provided by Polish National Science Centre (2011/02/A/NZ2/00014 to K.G., 2016/21/B/ST6/01471 to N.D., and 2015/17/D/NZ2/03711 to M.S.) and Foundation for Polish Science (TEAM to K.G.). Funding to M.R., B.F., and N.D. was provided by NIH (5 R01 GM 112131). J.C. acknowledges funding support from the Canadian Institutes of Health Research (FND-143314) and holds the Canada Research Chair in Chromatin Biology and Molecular Epigenetics. M.A. was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Funding in G.L.'s laboratory was provided by grants from the European Research Council (ERC-2014-CoG 647344), Agence Nationale pour la Recherche (ANR-14-CE10-0002-01 and ANR-13-BSV8-0013), the Institut National contre le Cancer (INCA), and the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC). T.C. is an INSERM researcher.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.C., C.A., and F.A. performed ChIP experiments. A.L. performed the SAGA complex purification, enzymatic assays, and DSB repair assays under the supervision of J.C. V.R., M.A., and J.S.I. performed bioinformatic analyses of ChIP and BLESS datasets. A.B., M.S., and K.G. performed BLESS experiments. M.R., B.F. and N.D. performed the comparison with Hi-C data. T.C. and G.L. conceived, supervised, and analyzed experiments. T.C. and G.L. wrote the manuscript. All authors commented on and edited the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: June 26, 2017

Revised: July 13, 2018

Accepted: August 13, 2018

Published: September 27, 2018

REFERENCES

- Alatwi, H.E., and Downs, J.A. (2015). Removal of H2A.Z by INO80 promotes homologous recombination. *EMBO Rep.* *16*, 986–994.
- Aymard, F., and Legube, G. (2016). A TAD closer to ATM. *Mol. Cell. Oncol.* *3*, e1134411.
- Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C.K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., Iacovoni, J.S., Daburon, V., Miller, K.M., Jackson, S.P., and Legube, G. (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 366–374.
- Aymard, F., Aguirrebengoa, M., Guillou, E., Javierre, B.M., Bugler, B., Arnould, C., Rocher, V., Iacovoni, J.S., Biernacka, A., Skrzypczak, M., et al. (2017). Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *24*, 353–361.
- Batta, K., Zhang, Z., Yen, K., Goffman, D.B., and Pugh, B.F. (2011). Genome-wide function of H2B ubiquitylation in promoter and genic regions. *Genes Dev.* *25*, 2254–2265.
- Bennett, G., and Peterson, C.L. (2015). SWI/SNF recruitment to a DNA double-strand break by the NuA4 and Gcn5 histone acetyltransferases. *DNA Repair (Amst.)* *30*, 38–45.
- Biehs, R., Steinlage, M., Barton, O., Juhasz, S., Kunzel, J., Spies, J., Shibata, A., Jeggo, P.A., and Lobrich, M. (2017). DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Mol. Cell* *65*, 671–684 e675.
- Caron, P., Aymard, F., Iacovoni, J.S., Briois, S., Canitrot, Y., Bugler, B., Massip, L., Losada, A., and Legube, G. (2012). Cohesin protects genes against γ H2AX Induced by DNA double-strand breaks. *PLoS Genet.* *8*, e1002460.
- Caron, P., Choudhary, J., Clouaire, T., Bugler, B., Daburon, V., Aguirrebengoa, M., Mangeat, T., Iacovoni, J.S., Álvarez-Quilón, A., Cortés-Ledesma, F., and Legube, G. (2015). Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Cell Rep.* *13*, 1598–1609.
- Chen, H., Ruiz, P.D., Novikov, L., Casill, A.D., Park, J.W., and Gamble, M.J. (2014). MacroH2A1.1 and PARP-1 cooperate to regulate transcription by promoting CBP-mediated H2B acetylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 981–989.
- Cheung, W.L., Turner, F.B., Krishnamoorthy, T., Wolner, B., Ahn, S.H., Foley, M., Dorsey, J.A., Peterson, C.L., Berger, S.L., and Allis, C.D. (2005). Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* *15*, 656–660.
- Clouaire, T., and Legube, G. (2015). DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision? *Nucleus* *6*, 107–113.
- Cohen, S., Puget, N., Lin, Y.L., Clouaire, T., Aguirrebengoa, M., Rocher, V., Pasero, P., Canitrot, Y., and Legube, G. (2018). Senataxin resolves RNA:DNA hybrids forming at DNA double-strand breaks to prevent translocations. *Nat. Commun.* *9*, 533.
- Crosetto, N., Mitra, A., Silva, M.J., Bienko, M., Dojer, N., Wang, Q., Karaca, E., Chiarle, R., Skrzypczak, M., Ginalski, K., et al. (2013). Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat. Methods* *10*, 361–365.
- Dalvai, M., Loehr, J., Jacquet, K., Huard, C.C., Roques, C., Herst, P., Côté, J., and Doyon, Y. (2015). A Scalable Genome-Editing-Based Approach for Mapping Multiprotein Complexes in Human Cells. *Cell Rep.* *13*, 621–633.
- Deplus, R., Blanchon, L., Rajavelu, A., Boukaba, A., Defrance, M., Luciani, J., Rothé, F., Dedeurwaerder, S., Denis, H., Brinkman, A.B., et al. (2014). Regulation of DNA methylation patterns by CK2-mediated phosphorylation of Dnmt3a. *Cell Rep.* *8*, 743–753.
- Dimitrova, N., Chen, Y.C., Spector, D.L., and de Lange, T. (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* *456*, 524–528.
- Dobbin, M.M., Madabhushi, R., Pan, L., Chen, Y., Kim, D., Gao, J., Ahanonu, B., Pao, P.C., Qiu, Y., Zhao, Y., and Tsai, L.H. (2013). SIRT1 collaborates with ATM and HDAC1 to maintain genomic stability in neurons. *Nat. Neurosci.* *16*, 1008–1015.
- Downs, J.A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S.J., Jackson, S.P., and Côté, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol. Cell* *16*, 979–990.
- Doyon, Y., and Côté, J. (2016). Preparation and Analysis of Native Chromatin-Modifying Complexes. *Methods Enzymol.* *573*, 303–318.
- Engel, M., Eggert, C., Kaplick, P.M., Eder, M., Röh, S., Tietze, L., Namendorf, C., Arloth, J., Weber, P., Rex-Haffner, M., et al. (2018). The Role of m6A/mRNA Methylation in Stress Response Regulation. *Neuron* *99*, 389–403.e9.
- Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T.J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E.E., Stein, A., Woodcock, C.L., and Skoultschi, A.I. (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* *123*, 1199–1212.
- Fleming, A.B., Kao, C.F., Hillyer, C., Pikaart, M., and Osley, M.A. (2008). H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Mol. Cell* *31*, 57–66.
- Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C., Huang, H., Landry, M.C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., and Durocher, D. (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* *499*, 50–54.
- Gong, F., Chiu, L.Y., Cox, B., Aymard, F., Clouaire, T., Leung, J.W., Cammarata, M., Perez, M., Agarwal, P., Brodbelt, J.S., et al. (2015). Screen identifies bromodomain protein ZMYND8 in chromatin recognition of transcription-associated DNA damage that promotes homologous recombination. *Genes Dev.* *29*, 197–211.
- Gong, F., Clouaire, T., Aguirrebengoa, M., Legube, G., and Miller, K.M. (2017). Histone demethylase KDM5A regulates the ZMYND8-NuRD chromatin remodeler to promote DNA repair. *J. Cell Biol.* *216*, 1959–1974.

- Gursoy-Yuzugullu, O., Ayrapetov, M.K., and Price, B.D. (2015). Histone chaperone Anp32e removes H2A.Z from DNA double-strand breaks and promotes nucleosome reorganization and DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *112*, 7507–7512.
- Helminger, D., and Tora, L. (2017). Sharing the SAGA. *Trends Biochem. Sci.* *42*, 850–861.
- Hustedt, N., and Durocher, D. (2016). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1–9.
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R.A., Jr., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* *432*, 406–411.
- Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* *29*, 1446–1457.
- Iannelli, F., Galbiati, A., Capozzo, I., Nguyen, Q., Magnuson, B., Michelini, F., D'Alessandro, G., Cabrini, M., Roncador, M., Francia, S., et al. (2017). A damaged genome's transcriptional landscape through multilayered expression profiling around in situ-mapped DNA double-strand breaks. *Nat. Commun.* *8*, 15656.
- Jacquet, K., Fradet-Turcotte, A., Avvakumov, N., Lambert, J.P., Roques, C., Pandita, R.K., Paquet, E., Herst, P., Gingras, A.C., Pandita, T.K., et al. (2016). The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Binding and H2AK15 Acetylation. *Mol. Cell* *62*, 409–421.
- Kakarougkas, A., Ismail, A., Klement, K., Goodarzi, A.A., Conrad, S., Freire, R., Shibata, A., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2013). Opposing roles for 53BP1 during homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* *41*, 9719–9731.
- Khurana, S., Kruhlak, M.J., Kim, J., Tran, A.D., Liu, J., Nyswaner, K., Shi, L., Jailwala, P., Sung, M.H., Hakim, O., and Oberdoerffer, P. (2014). A macrohistone variant links dynamic chromatin compaction to BRCA1-dependent genome maintenance. *Cell Rep.* *8*, 1049–1062.
- Kleiner, R.E., Verma, P., Molloy, K.R., Chait, B.T., and Kapoor, T.M. (2015). Chemical proteomics reveals a γ H2AX-53BP1 interaction in the DNA damage response. *Nat. Chem. Biol.* *11*, 807–814.
- Lee, H.S., Park, J.H., Kim, S.J., Kwon, S.J., and Kwon, J. (2010). A cooperative activation loop among SWI/SNF, gamma-H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. *EMBO J.* *29*, 1434–1445.
- Marnef, A., and Legube, G. (2017). Organizing DNA repair in the nucleus: DSBs hit the road. *Curr. Opin. Cell Biol.* *46*, 1–8.
- Marnef, A., Cohen, S., and Legube, G. (2017). Transcription-Coupled DNA Double-Strand Break Repair: Active Genes Need Special Care. *J. Mol. Biol.* *429*, 1277–1288.
- McGinty, R.K., Kim, J., Chatterjee, C., Roeder, R.G., and Muir, T.W. (2008). Chemically ubiquitylated histone H2B stimulates hDot1L-mediated intranucleosomal methylation. *Nature* *453*, 812–816.
- Miller, K.M., Tjeertes, J.V., Coates, J., Legube, G., Polo, S.E., Britton, S., and Jackson, S.P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1144–1151.
- Mitra, A., Skrzypczak, M., Ginalski, K., and Rowicka, M. (2015). Strategies for achieving high sequencing accuracy for low diversity samples and avoiding sample bleeding using illumina platform. *PLoS ONE* *10*, e0120520.
- Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., and Iliakis, G. (2016). DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin. Cancer Biol.* *37*, 38, 51–64.
- Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E., and Shen, X. (2004). INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* *119*, 767–775.
- Moyal, L., Lerenthal, Y., Gana-Weisz, M., Mass, G., So, S., Wang, S.Y., Eppink, B., Chung, Y.M., Shalev, G., Shema, E., et al. (2011). Requirement of ATM-dependent monoubiquitylation of histone H2B for timely repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* *41*, 529–542.
- Nakamura, K., Kato, A., Kobayashi, J., Yanagihara, H., Sakamoto, S., Oliveira, D.V., Shimada, M., Tauchi, H., Suzuki, H., Tashiro, S., et al. (2011). Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Mol. Cell* *41*, 515–528.
- Noon, A.T., Shibata, A., Rief, N., Löbrich, M., Stewart, G.S., Jeggo, P.A., and Goodarzi, A.A. (2010). 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat. Cell Biol.* *12*, 177–184.
- Ogiwara, H., Ui, A., Otsuka, A., Satoh, H., Yokomi, I., Nakajima, S., Yasui, A., Yokota, J., and Kohno, T. (2011). Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene* *30*, 2135–2146.
- Panier, S., and Boulton, S.J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 7–18.
- Pauly, J., Couturier, A.M., Rodrigue, A., Caron, M.C., Coulombe, Y., Delleire, G., and Masson, J.Y. (2017). Cancer-causing mutations in the tumor suppressor PALB2 reveal a novel cancer mechanism using a hidden nuclear export signal in the WD40 repeat motif. *Nucleic Acids Res.* *45*, 2644–2657.
- Pellegrino, S., Michelena, J., Teloni, F., Imhof, R., and Altmeyer, M. (2017). Replication-Coupled Dilution of H4K20me2 Guides 53BP1 to Pre-replicative Chromatin. *Cell Rep.* *19*, 1819–1831.
- Pinder, J., Salsman, J., and Delleire, G. (2015). Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Res.* *43*, 9379–9392.
- Ramachandran, S., Haddad, D., Li, C., Le, M.X., Ling, A.K., So, C.C., Nepal, R.M., Gommerman, J.L., Yu, K., Ketela, T., et al. (2016). The SAGA Deubiquitination Module Promotes DNA Repair and Class Switch Recombination through ATM and DNAPK-Mediated γ H2AX Formation. *Cell Rep.* *15*, 1554–1565.
- Rao, S.S., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A.L., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S., and Aiden, E.L. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* *159*, 1665–1680.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* *273*, 5858–5868.
- Ropars, V., Drevet, P., Legrand, P., Baconnais, S., Amram, J., Faure, G., Márquez, J.A., Piétrement, O., Guerois, R., Callebaut, I., et al. (2011). Structural characterization of filaments formed by human Xrcc4-Cernunnos/XLF complex involved in nonhomologous DNA end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, 12663–12668.
- Savic, V., Yin, B., Maas, N.L., Bredemeyer, A.L., Carpenter, A.C., Helmink, B.A., Yang-lott, K.S., Sleckman, B.P., and Bassing, C.H. (2009). Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Mol. Cell* *34*, 298–310.
- Schipler, A., and Iliakis, G. (2013). DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7589–7605.
- Schwertman, P., Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2016). Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 379–394.
- Segala, G., Bennesch, M.A., Pandey, D.P., Hulo, N., and Picard, D. (2016). Monoubiquitination of Histone H2B Blocks Eviction of Histone Variant H2A.Z from Inducible Enhancers. *Mol. Cell* *64*, 334–346.
- Sellou, H., Lebeaupin, T., Chapuis, C., Smith, R., Hegele, A., Singh, H.R., Kozłowski, M., Bultmann, S., Ladurner, A.G., Timinszky, G., and Huet, S. (2016). The poly(ADP-ribose)-dependent chromatin remodeler Alc1 induces local chromatin relaxation upon DNA damage. *Mol. Biol. Cell* *27*, 3791–3799.
- Soshnev, A.A., Josefowicz, S.Z., and Allis, C.D. (2016). Greater Than the Sum of Parts: Complexity of the Dynamic Epigenome. *Mol. Cell* *62*, 681–694.

- Strickfaden, H., McDonald, D., Kruhlak, M.J., Haince, J.F., Th'ng, J.P., Rouleau, M., Ishibashi, T., Corry, G.N., Ausio, J., Underhill, D.A., et al. (2016). Poly(ADP-ribose)ation-dependent Transient Chromatin Decondensation and Histone Displacement following Laser Microirradiation. *J. Biol. Chem.* *291*, 1789–1802.
- Sun, Z.W., and Allis, C.D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* *418*, 104–108.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2017). Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 115–126.
- Tang, J., Cho, N.W., Cui, G., Manion, E.M., Shanbhag, N.M., Botuyan, M.V., Mer, G., and Greenberg, R.A. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 317–325.
- Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T.K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2015). Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* *527*, 389–393.
- Toiber, D., Erdel, F., Bouazoune, K., Silberman, D.M., Zhong, L., Mulligan, P., Sebastian, C., Cosentino, C., Martinez-Pastor, B., Giacosa, S., et al. (2013). SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling. *Mol. Cell* *51*, 454–468.
- Utley, R.T., Lacoste, N., Jobin-Robitaille, O., Allard, S., and Côté, J. (2005). Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 8179–8190.
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and Gasser, S.M. (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* *119*, 777–788.
- Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G., and Chen, J. (2003). Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J. Biol. Chem.* *278*, 19579–19582.
- Wilson, M.D., Benlekbir, S., Fradet-Turcotte, A., Sherker, A., Julien, J.P., McEwan, A., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., Rubinstein, J.L., and Durocher, D. (2016). The structural basis of modified nucleosome recognition by 53BP1. *Nature* *536*, 100–103.
- Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y., and Price, B.D. (2012). Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* *48*, 723–733.
- Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A.D., Mandal, S.S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol. Cell* *20*, 601–611.

A cohesin/HUSH- and LINC-dependent pathway controls ribosomal DNA double-strand break repair

Aline Marnef,¹ Anne-Laure Finoux,^{1,4} Coline Arnould,^{1,4} Emmanuelle Guillou,¹ Virginie Daburon,¹ Vincent Rocher,¹ Thomas Mangeat,¹ Philippe E. Mangeot,² Emiliano P. Ricci,³ and Gaëlle Legube¹

¹Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération (LBCMCP), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Toulouse, Toulouse 31062, France; ²International Center for Infectiology Research (CIRI), Ecole Normale Supérieure de Lyon (ENS), U1111, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR5308, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Claude Bernard Lyon 1, Université Lyon, Lyon F-69000, France; ³Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule (LBCM), Ecole Normale Supérieure de Lyon (ENS), U1210, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR5239, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon F-69007, France

The ribosomal DNA (rDNA) represents a particularly unstable locus undergoing frequent breakage. DNA double-strand breaks (DSBs) within rDNA induce both rDNA transcriptional repression and nucleolar segregation, but the link between the two events remains unclear. Here we found that DSBs induced on rDNA trigger transcriptional repression in a cohesin- and HUSH (human silencing hub) complex-dependent manner throughout the cell cycle. In S/G2 cells, transcriptional repression is further followed by extended resection within the interior of the nucleolus, DSB mobilization at the nucleolar periphery within nucleolar caps, and repair by homologous recombination. We showed that nuclear envelope invaginations frequently connect the nucleolus and that rDNA DSB mobilization, but not transcriptional repression, involves the nuclear envelope-associated LINC complex and the actin pathway. Altogether, our data indicate that rDNA break localization at the nucleolar periphery is not a direct consequence of transcriptional repression but rather is an active process that shares features with the mobilization of persistent DSB in active genes and heterochromatin.

[*Keywords:* DSB repair; HUSH; LINC; chromatin; cohesin; ribosomal DNA]

Supplemental material is available for this article.

Received January 4, 2019; revised version accepted June 26, 2019.

Double-strand breaks (DSBs) are highly harmful lesions that arise on DNA following exposition to damaging agents but also during normal cell metabolic activity. Importantly, genome-wide mapping of endogenous DSBs has indicated that they preferentially occur on the transcribing genome as an occasional consequence of topoisomerase activity or processing of DNA secondary structures (such as R loops and G quadruplexes) or due to replication fork stalling and/or collapse (for review, see Marnef et al. 2017; Tubbs and Nussenzweig 2017). Multiple repair pathways cope with such lesions, including nonhomologous end joining (NHEJ), which reseals DNA ends with no or minimal processing throughout the cell cycle phases, and homology-driven mechanisms, which take place

in S and G2 and rely on the generation of ssDNA through a process called resection (for review, see Mladenov et al. 2016). Notably, these repair mechanisms trigger different mutational signatures when inaccurate, such as point mutations, translocations, or repeat amplification (Mladenov et al. 2016).

Recent work revealed that the initial genomic context in which a DSB occurs plays a critical role in the decision that will assign a specific repair pathway to the detected break (Clouaire and Legube 2015). We found previously that DSBs induced in transcribing loci are channeled to homologous recombination (HR) in G2 thanks to H3K36me3-dependent signaling (Aymard et al. 2014), while they tend to persist and relocate within DSB clusters during the G1 cell cycle phase (Aymard et al. 2017). Notably, movement into DSB clusters relies on ATM activity, the MRN complex, the nuclear envelope (NE)-

⁴These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors: gaelle.legube@univ-tlse3.fr, aline.marnef@univ-tlse3.fr

Article published online ahead of print. Article and publication date are online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.324012.119>. Freely available online through the *Genes & Development* Open Access option.

© 2019 Marnef et al. This article, published in *Genes & Development*, is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

Marnet et al.

embedded LINC complex, and the actin network (Aymard et al. 2017; Schrank et al. 2018; for review, see Guérolé and Legube 2017). Additionally, repair at active genes also necessitates prior transcriptional extinction of the damaged gene in a manner that depends on ATM activity, chromatin remodeling complexes (PBAF), and repressive histone modifications (Shanbhag et al. 2010; Kakarougkas et al. 2014; Ui et al. 2015). On the other hand, DSBs induced elsewhere in euchromatin (on inactive genes and intergenic regions) do not tend to move into clusters but rather are repaired by NHEJ in both G1 and G2 (Aymard et al. 2014).

DSBs located in heterochromatin that is tightly packaged, transcriptionally silent, and primarily composed of repetitive elements also display a specialized repair behavior (Noon et al. 2010; Goodarzi et al. 2011; Frohns et al. 2014). Notably, the use of HR involves the repositioning of the break at the periphery of the heterochromatin domain (Chiolo et al. 2011; Jakob et al. 2011; Tsouroula et al. 2016; Colmenares et al. 2017) and at the NE (Chiolo et al. 2011; Ryu et al. 2015; Colmenares et al. 2017; Caridi et al. 2018) in *Drosophila* in a manner that involves the actin network (Caridi et al. 2018).

The ribosomal DNA (rDNA) is another genomic region exhibiting a unique and specialized chromatin structure due to its repetitive nature, elevated level of secondary structures (R loops and G4), and considerable transcriptional activity (for review, see Lindström et al. 2018). In human cells, the ~300 rDNA repeats are distributed between the short arms of the five acrocentric chromosomes, each of which contains a nucleolar organizer region (NOR), around which nucleoli form (McStay 2016). It is well described that inhibition of rRNA synthesis triggers a complete nucleolar reorganization, with the movement and segregation of the inactivated rDNA at the periphery of the nucleolus in the so-called “nucleolar caps,” with most caps corresponding to a single NOR (Floutsakou et al. 2013). This strong dependency of nucleolus morphology on active rDNA transcription led to the idea that the nucleolus is a self-organizing compartment ensured by the massive amount of RNAs produced and RNA-binding proteins, potentially through a liquid-demixing process, which is now supported by several pieces of evidence (Németh and Grummt 2018). From yeast to humans, the rDNA poses a challenge in terms of genome maintenance. Previous studies established that the rDNA is particularly susceptible to breakage, probably due to multiple secondary DNA structures, high RNA polymerase I (Pol I) occupancy, and tightly DNA-bound regulatory proteins, which generate a high incidence of replication fork stalling and/or collapse (Lindström et al. 2018). Additionally, its highly repetitive nature renders this locus particularly prone to rearrangements, generating translocations, extra-chromosomal circles, and repeat contractions/expansions (Lindström et al. 2018). However, the DSB signaling and repair mechanisms that cope with this peculiar locus are only recently emerging in human cells.

Similarly to RNA Pol II transcribed genes, production of DSBs in the nucleolus rapidly elicits a local rDNA transcriptional shutdown in an ATM- and Nbs1-dependent

manner (Kruhlak et al. 2007; Larsen et al. 2014; Harding et al. 2015; van Sluis and McStay 2015; Warmerdam et al. 2016). Such DSB-induced transcriptional repression is believed to trigger the segregation of the rDNA at the periphery of the nucleolus and the formation of the nucleolar caps (Kruhlak et al. 2007; Larsen et al. 2014; Harding et al. 2015; van Sluis and McStay 2015; Warmerdam et al. 2016). In terms of repair, the general picture is still blurry. Indeed, while the induction of DSBs on the rDNA array was reported to be largely repaired by HR within nucleolar caps even during G1 (van Sluis and McStay 2015), another report argues for a DNA-PK-dependent NHEJ repair pathway (Harding et al. 2015).

Here we reveal that the nucleolar cap formation observed upon rDNA damage is not the direct consequence of transcriptional arrest but rather reflects an active mechanism that allows the mobilization of resected DSBs to the nucleolar periphery to further undergo repair by HR. We identified the cohesin and human silencing hub (HUSH) complexes as involved in rDNA transcriptional repression upon damage, while DSB mobilization at the periphery of the nucleolus is ensured by an actin network and a LINC-dependent mechanism. Strikingly, the NE forms invaginations that contact the nucleolus, likely providing a safe environment for persistent DSB repair, as shown in yeast and *Drosophila*.

Results

Uncoupling between transcriptional arrest and nucleolar cap formation upon rDNA breakage

In order to investigate the rDNA breakage response and repair, we used the human DiVA stable cell line, in which relocation of the ectopic AsiSI restriction enzyme from the cytoplasm to the nucleus can be induced upon 4-hydroxytamoxifen (OHT) addition, allowing the formation of DSBs (Iacovoni et al. 2010). In addition to the DSBs induced elsewhere on the genome (174, as determined previously) (Clouaire et al. 2018), an AsiSI site (GCGATCGC) is predicted in the 5' external transcribed spacer (5' ETS) of the 47S rDNA units (Fig. 1A). We confirmed the appearance of a rDNA break at the AsiSI-annotated site after OHT addition by direct in situ break labeling, enrichment on streptavidin, and next-generation sequencing (BLESS) (Fig. 1B; Crosetto et al. 2013; Clouaire et al. 2018). Several studies showed previously that DSBs induced in the rDNA trigger inhibition of rRNA synthesis as well as nucleolar cap formation (Kruhlak et al. 2007; Larsen et al. 2014; Harding et al. 2015; van Sluis and McStay 2015; Warmerdam et al. 2016). AsiSI-induced rDNA breaks also triggered similar responses regarding rDNA transcriptional repression, as assessed by 5-fluorouridine (5-FUrd) incorporation followed by automated high-throughput microscopy (Fig. 1C,D), and nucleolar cap formation, as revealed by RNA Pol I (Fig. 1E–G; Supplemental Fig. S1A; Supplemental Movie S1) or UBF (Supplemental Fig. S1B,C) staining.

After OHT treatment, nucleolar cap formation occurred in only a subset of DiVA cells (~35%) (Fig. 1G;

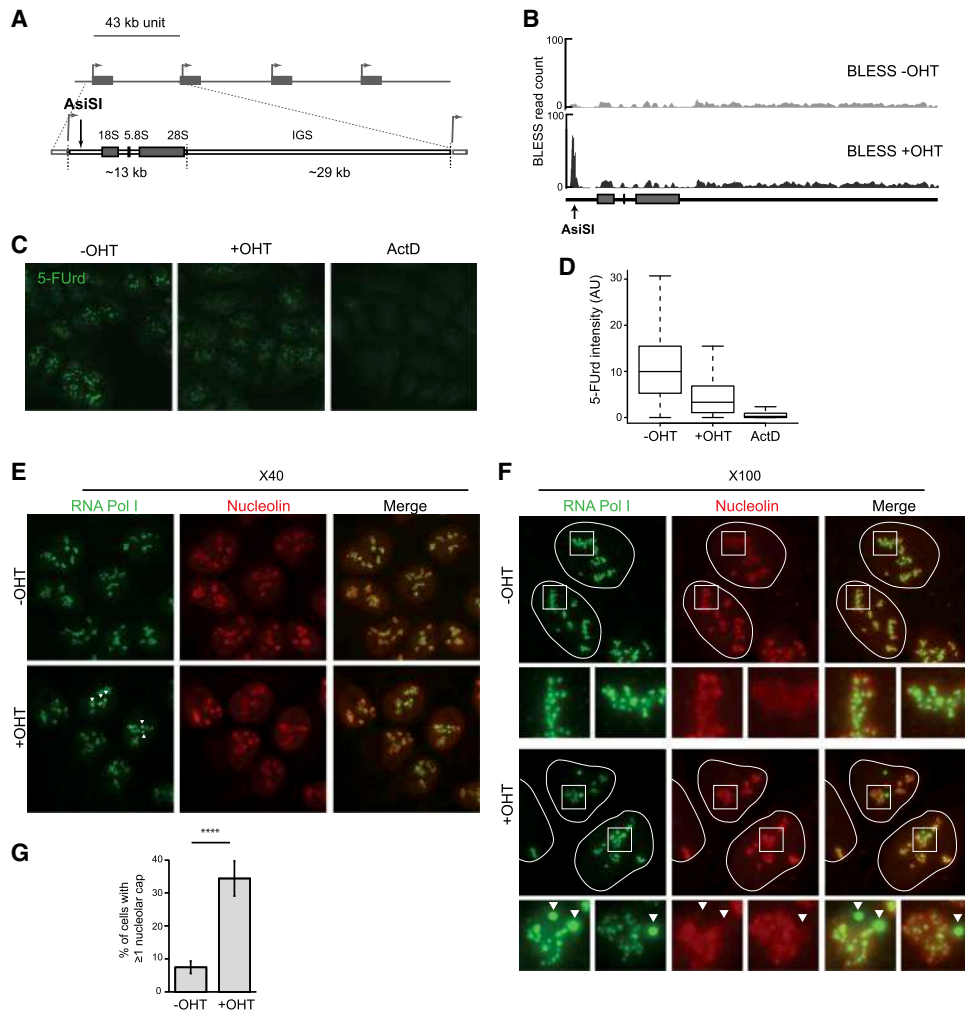


Figure 1. Transcription inhibition and cap formation following AsiSI-induced rDNA breaks. (A) Schematic representation of rDNA repeats and the position of the AsiSI site in the 5' ETS. (B) BLESS signal at the AsiSI site in the presence or absence of OHT treatment. (C) High-content microscopy image (20 \times objective) of rRNA synthesis as visualized with 5-FUrd incorporation before and after OHT and actinomycin D (ActD) treatments. Actinomycin D was used as a control for the extinction of rRNA synthesis. (D) Box plot showing the quantification of 5-FUrd signal (>5000 cells) before OHT, after OHT, and after actinomycin D treatment. A representative experiment is shown. (E) DivA cells either before or after OHT treatment were stained with antibodies against nucleolin (red) and RNA Pol I (green). Nucleolar caps are indicated with arrows. Images were acquired with a 40 \times objective. (F) Same as in E, but images were acquired with a 100 \times objective. Enlargements (white squares) of nucleoli that display nucleolar caps (arrow) or not are also shown. (G) The number of cells with at least one nucleolar cap, as measured by RNA Pol I staining before and after OHT treatment as indicated. The average and SD of four independent experiments are shown. (****) $P < 0.0001$.

Supplemental Fig. S1C), in contrast to what was reported previously following rDNA breaks generated by CRISPR/Cas9 (see also Supplemental Fig. S1D–F; van Sluis and McStay 2015). In addition, nucleolar segregation observed following AsiSI was only partial (Supplemental Fig. S1G, H), unlike following actinomycin D treatment (Supplemental Fig. S1E–H). Blocking AsiSI-induced rDNA repair with an inhibitor against DNA-PK (Caron et al. 2015) enhanced both the number of cells displaying at least one nucleolar cap (Supplemental Fig. S1E,F) and the number of cells displaying total nucleolar segregation (Supplemental Fig. S1G,H), hence mimicking the phenotypes observed with CRISPR/Cas9. Moreover, inducing rDNA

breaks using simultaneously a CRISPR sgRNA and AsiSI also enhanced nucleolar cap formation compared with AsiSI alone (Supplemental Fig. S1I,J). Altogether, these data suggest that the discrepancy in nucleolar segregation observed upon AsiSI- and CRISPR/Cas9-induced breakage is likely due to the peculiar nature of Cas9-induced breaks (see the Discussion; Brinkman et al. 2018).

Given that only a subset of DivA cells displayed nucleolar caps, we wondered whether this could be cell cycle-regulated. EdU labeling and Cyclin B1 costaining revealed that nucleolar caps are observed mainly in S/G2 cells (Fig. 2A,B) even though rDNA cleavage was detected efficiently by BLESS in G1 and G2 cells (Supplemental Fig.

Marnet et al.

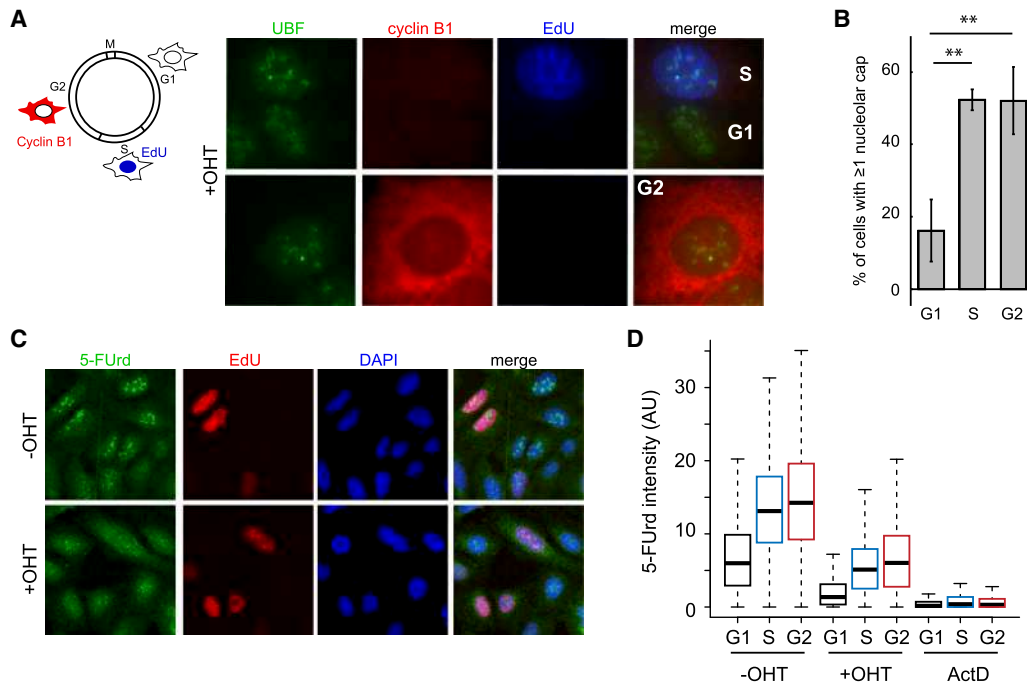


Figure 2. Decoupling of transcription inhibition and cap formation during the cell cycle. (*A*, left panel) Schematic representation of the cell cycle and the methods used to visualize the G2 cells (cytoplasmic cyclin B1 staining in red), S-phase cells (nuclear EdU staining in blue), or G1 cells (absence of staining). (*Right panel*) Images of OHT-treated cells showing the presence of nucleolar caps (assessed by UBF staining) in EdU- or cyclin B1-positive cells. (*B*) The number of cells with at least one nucleolar cap in G1, S, or G2 phases as counted with UBF. The mean and SD from three independent experiments are shown. (**) $P < 0.01$. (*C*) Representative images with a 20 \times objective from the QIBC analysis of the 5-FUrd levels (transcription) using EdU labeling (DNA synthesis) and DAPI staining to distinguish cell cycle phases. (*D*) A representative box plot of the quantification of the 5-FUrd level (>1500 cells) across the cell cycle phase (G1 [black], S [blue], and G2 [red]) following OHT or actinomycin D (ActD) treatment (as indicated).

S2A). The fact that nucleolar caps were substantially reduced in G1 therefore gave us the opportunity to test whether nucleolar cap formation is a consequence of transcriptional arrest as proposed previously (van Sluis and McStay 2015). We observed that DSB-induced transcriptional arrest occurs similarly during G1, S, and G2, as measured by quantitative image-based cytometry (QIBC) coupled with 5-FUrd incorporation (Fig. 2C,D; Supplemental Fig. S2B), hence demonstrating that nucleolar cap formation is not solely the consequence of the rDNA transcriptional repression.

Extended resection occurs within the nucleolus at rDNA breaks

To investigate how rDNA DSB repair is orchestrated within the nucleolus, we further performed immunostaining against DSB signaling and repair proteins. As reported previously at CRISPR/Cas9- or I-PpoI-induced rDNA DSBs (Harding et al. 2015; Franek et al. 2016; Warmerdam et al. 2016), we found that AsiSI-rDNA breaks recruited γ H2AX, ubiquitin, MDC1, 53BP1, and RIF1 only at the periphery of the nucleolus at nucleolar caps (Supplemental Fig. S3A–C,F). Similarly, proteins involved in HR (Rad51 and BRCA1) also accumulated at nucleolar caps (Supplemental Fig. S3D–F), indicating that DSB mobilization at

the periphery of the nucleolus is a prerequisite for HR protein assembly. We therefore looked for the status of DNA end resection, which constitutes an early step of HR repair. Accumulation of RPA and phosphorylated RPA at Ser33 (RPA2-S33P), indicative of end resection, was clearly detected after DSB induction both inside the nucleolus and in nucleolar caps (Fig. 3A,B; Supplemental Fig. S3F). As expected, RPA2-S33P staining was detected mainly in S/G2 cells (Supplemental Fig. S3G). In contrast, actinomycin D treatment only mildly induced RPA staining, indicating that, in nucleoli, RPA accumulation is specific to DSB formation (Fig. 3C).

Interestingly, superresolution microscopy showed a mutual exclusion of RPA2-S33P and γ H2AX once relocated at nucleolar caps (Fig. 3D). In order to further characterize resection at rDNA breaks, we performed RPA2-S33P chromatin immunoprecipitation (ChIP). In agreement with superresolution microscopy, RPA2-S33P distribution was found to be antagonistic to that of γ H2AX (Fig. 3E, top and middle panels). Of note, low γ H2AX occupancy on the transcribed region is likely due to decreased nucleosome occupancy rather than decreased DDR kinase activity, as indicated by ChIP against H2AX (Supplemental Fig. S3H). Strikingly, RPA2-S33P was massively recruited across the 13 kb of the transcribed region, as indicated by RNA Pol I binding (Fig. 3E, bottom panel),

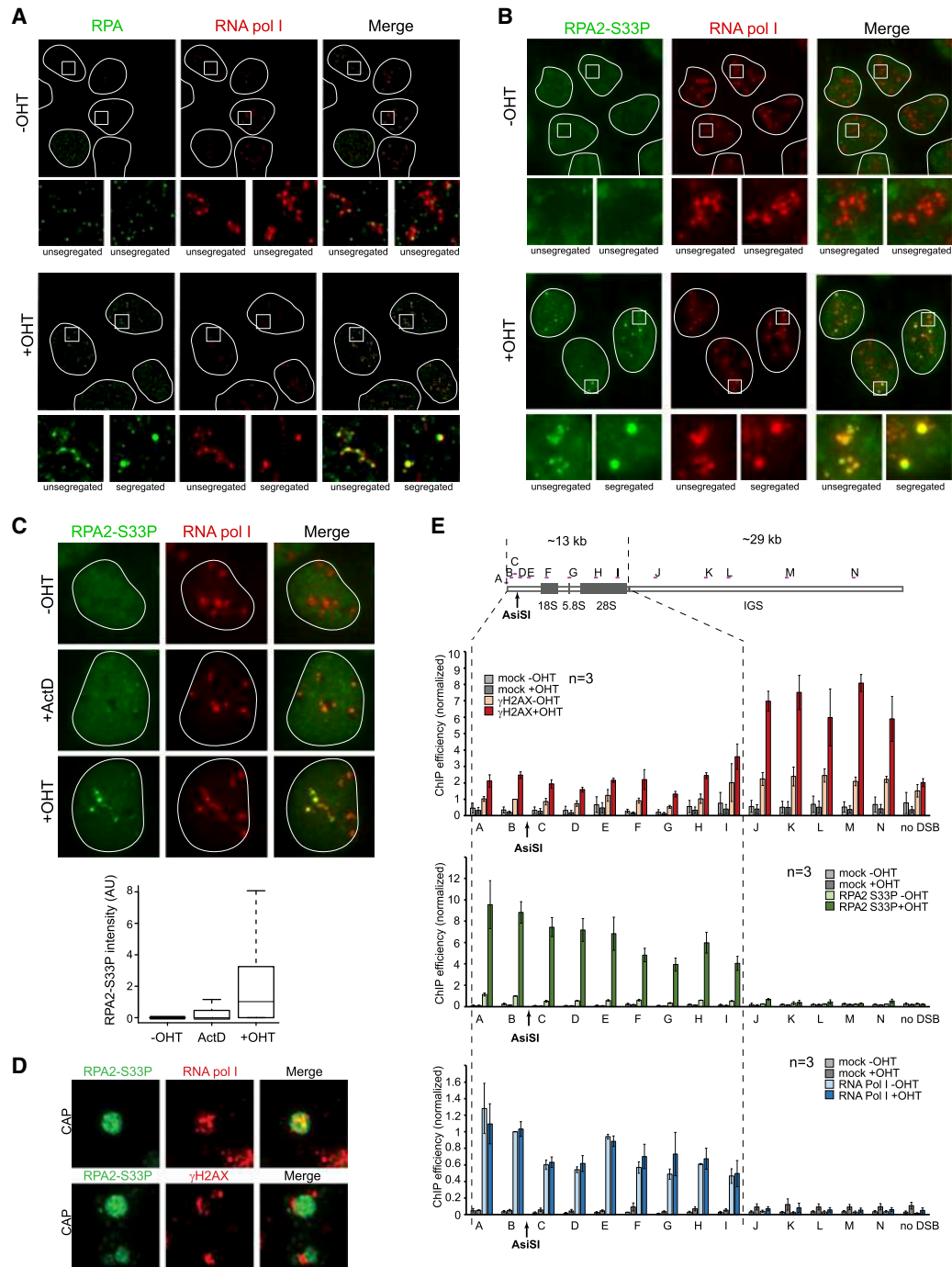


Figure 3. Extended resection along the transcribed region occurs within the nucleolus. (A) DivA cells left untreated or treated for 4 h with OHT (as indicated) were stained with RNA Pol I (red) and RPA2 (green). Examples of RPA2 staining in normal and segregated (nucleolus with at least one cap) nucleoli are shown in magnification at the *bottom*. (B) Same as in A, except that total RPA2-S33P was stained (green). (C) Untreated (–OHT), actinomycin D-treated (ActD), or OHT-treated DivA cells stained with RPA2-S33P (green) and RNA pol I (red). Box plot of RPA2-S33P nucleolar intensity in the indicated conditions. A representative experiment is shown. (D, *top* panel) A schematic representation of the primers used across the rDNA unit for quantitative PCR (qPCR). Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-qPCR were performed using antibodies against gH2AX, RPA2-S33P, and RNA Pol I in DivA cells left untreated or treated for 4 h with OHT (as indicated). The mean of normalized ChIP efficiency and SEM of three independent experiments are shown. (E) Superresolution images depicting the presence of RPA2-S33P (green) and RNA pol I (red) within nucleolar caps (*top*) or the mutual exclusion of RPA2-S33P (green) in caps and γ H2AX (red) surrounding the caps (*bottom*).

Marnet et al.

indicating that resection takes place on the entire transcribed unit.

We further tested whether resection is a prerequisite for DSB mobilization in nucleolar caps. Blocking NHEJ in G1 cells using a DNA-PK inhibitor enhanced both resection (RPA2-S33P staining) and cap formation, suggesting a relationship between resection and DSB mobilization (Supplemental Fig. S4). Furthermore, depletion of the Mre11 component of the MRN complex (known to initiate resection), of BLM/DNA2 (mediating long-range resection) (Bordelet and Dubrana 2019), and of RPA2 all impaired nucleolar cap formation (Fig. 4A–C).

Altogether, our data suggest that, in S/G2, rDNA DSBs undergo extensive resection spanning the entire transcribed unit within the interior of the nucleolus. This resection event is further required for the movement of rDNA DSBs at the periphery of the nucleolus, where both signaling (γ H2AX, MDC1, and ubiquitin chain formation) and HR (Rad51 and BRCA1 binding) can occur.

The cohesin complex ensures transcriptional repression, DSB mobilization, and HR repair

We further turned our attention toward the cohesin complex, given its pleiotropic involvements in rDNA stability and transcriptional regulation, DSB repair, and chromosome structure and mobility (Kobayashi et al. 2004; Caron et al. 2012; Gelot et al. 2016a; Herdman et al. 2017; Pal et al. 2018). Depletion of the SMC1, SCC1, and SMC3 cohesin subunits triggered a decrease in nucleolar cap formation following rDNA breakage (Fig. 5A; Supplemental Fig. S5A,B) without strongly affecting cell cycle distribution (Supplemental Fig. S5C). Cohesin depletion also prevented both resection (as measured by RPA2-S33P foci) (Fig. 5B) and transcriptional repression following rDNA damage (Fig. 5C; Supplemental Fig. S5D,F). At rDNA genes, HR frequently triggers rDNA arrays rearrangement, which can be visualized using DNA FISH on individual fibers (Fig. 5D). OHT-mediated rDNA DSB induction in control cells led to an increase of noncanonical

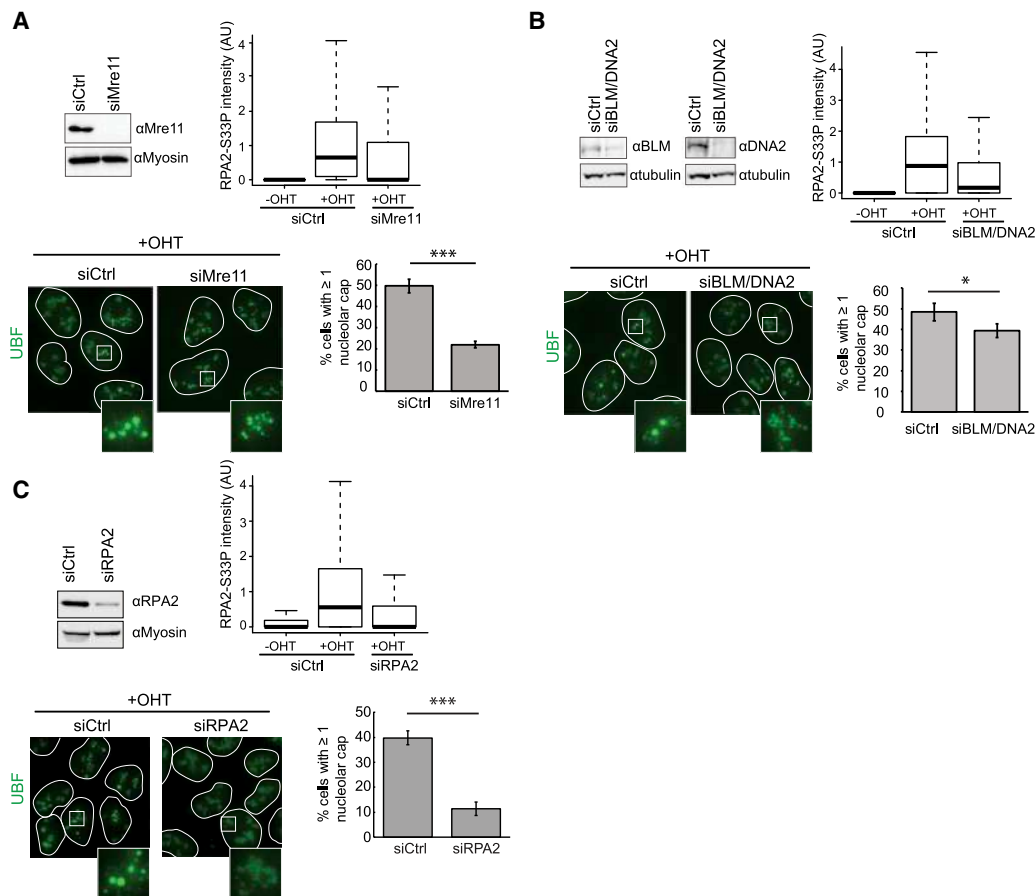


Figure 4. Resection is a prerequisite for nucleolar cap formation. (A, top panels) Western blots (left) and representative box plots of the level of RPA2-S33P nucleolar intensity (right) after Mre11 or control siRNA knockdown followed by 4 h of OHT treatment in DivA cells (>100 nucleoli quantified). (Bottom panels) UBF staining was performed in OHT-treated Mre11 or control siRNA transfected DivA cells. An example (left) and quantification of the percentage of cells displaying at least one nucleolar cap (right) are shown. The mean and SD from three independent experiments are shown. (***) $P < 0.001$. (B) Same as in A, except that BLM/DNA2 were knocked down by siRNAs. The mean and SD from three independent experiments are shown. (*) $P < 0.05$. (C) Same as in A, except that RPA2 was knocked down by siRNAs. The mean and SD from three independent experiments are shown. (***) $P < 0.001$.

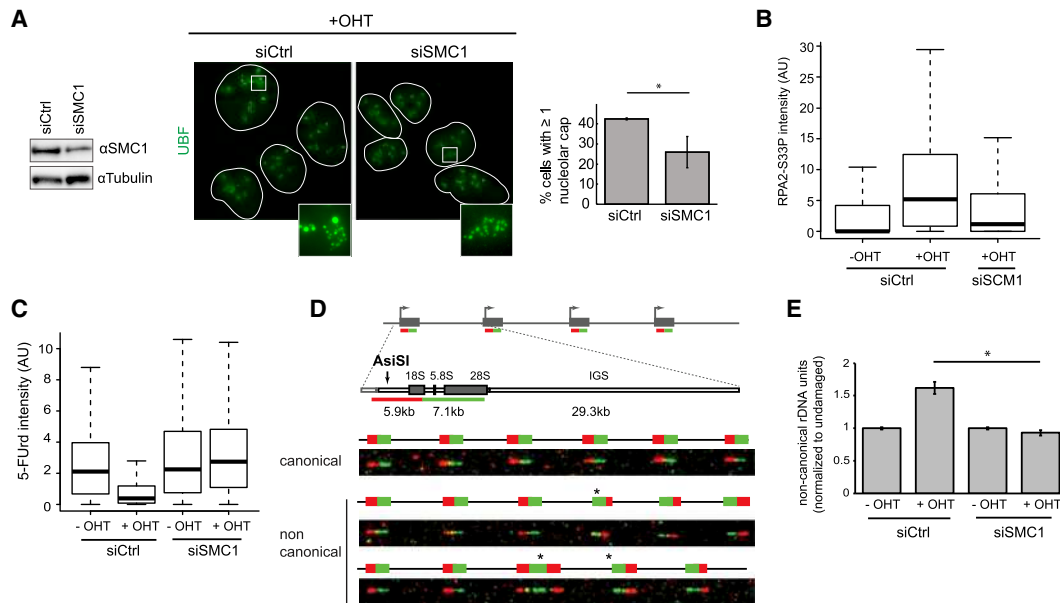


Figure 5. The cohesin complex regulates rDNA transcriptional repression, resection, DSB mobilization, and HR repair following rDNA breakage. (A, left) Western blot using SMC1 and tubulin antibodies in control or SMC1 siRNA transfected DivA cells. (Middle) Control or SMC1-depleted DivA cells treated for 4 h with OHT were stained using an UBF antibody to detect nucleoli and nucleolar caps. (Right) The number of cells with at least one nucleolar cap was quantified. The mean and SD from three independent experiments are shown. (*) $P < 0.05$. (B) Representative box plot of nucleolar RPA2-S33P intensity after SMC1 or control siRNA knockdown (>100 nucleoli quantified). (C) Representative box plot of the 5-FUrd signal before or after 4 h of OHT treatment in control or SMC1-depleted DivA cells (>1000 cells). (D) Schematic representation of the rDNA repeats and the two fluorescent probes (red and green) used to measure rDNA rearrangements by DNA FISH combing (top), with examples of canonical and noncanonical rDNA units (indicated by an asterisk; bottom). (E) The level of noncanonical rDNA units measured by FISH combing before or after 24 h of OHT treatment in control or SMC1-depleted cells. (*) $P < 0.05$.

units indicative of rDNA rearrangements, which was abolished upon SMC1 depletion using siRNA (Fig. 5E), in agreement with a function of cohesin in promoting HR at rDNA units.

The above data therefore suggest that the cohesin complex acts at an early step in the rDNA DSB response and contributes to the DSB-induced transcriptional repression at rDNA, thereby influencing all downstream events; i.e., resection, DSB mobilization, and HR repair.

Transcriptional repression requires HUSH-mediated H3K9me3 deposition

In order to identify potential effectors of the cohesin complex that could mediate transcriptional repression of damaged rDNA, we engineered a DivA cell line overexpressing a Flag-GFP-tagged version of SMC1 (Supplemental Fig. S5G). Tandem purification of SMC1 interactors in the nucleus and nucleolus before and after DSB production followed by mass spectroscopy analysis (Supplemental Fig. S5H) allowed the identification of candidates, among which was periphilin 1, a subunit of the recently identified HUSH complex. This complex, composed of (at least) periphilin, MPP8, and TASOR, is involved in the epigenetic repression of retroviruses and LINE-1 retrotransposons via H3K9 trimethylation (H3K9me3) (Tchasochnikarova et al. 2015; Liu et al. 2018; Robbez-Masson et al. 2018). Indeed, depletion of MPP8 alleviated DSB-in-

duced transcriptional repression of rDNA (Fig. 6A; Supplemental Fig. S6A), as observed after depletion of the cohesin complex. In agreement, MPP8 depletion also translated into decreased cap formation following rDNA damage (Fig. 6B), with no effect on the cell cycle (Supplemental Fig. S6B), suggesting that the HUSH complex contributes to rDNA transcription shutdown following rDNA breakage.

Because the HUSH complex was suggested to mediate transcriptional silencing through H3K9me3, we assessed the levels of this chromatin mark on rDNA following DSB induction. An accumulation of H3K9me3 on rDNA was clearly detected, mostly in the transcribed region after DSB induction (Fig. 6C; Supplemental Fig. S6C). In mammalian cells, H3K9 trimethylation is catalyzed mostly by SUV39H1/2 and SETDB1 (Rea et al. 2000; Schultz et al. 2002); the latter is suggested to be involved in HUSH-dependent H3K9 trimethylation (Tchasochnikarova et al. 2015). Knockdown of both SUV39H1/2 and SETDB1 decreased global H3K9me3 levels in DivA cells, as expected (Fig. 6D; Supplemental Fig. S6D). However, on rDNA, only depletion of SUV39H1/2 led to a detectable H3K9me3 decrease (Fig. 6E). The lack of SETDB1 effects at the rDNA appears to be a genuine response, as H3K9me3 level decreased upon SETDB1 depletion on zinc finger genes, as described previously (Supplemental Fig. S6E; Tchasochnikarova et al. 2015). In agreement with the above data, only SUV39H1/2 depletion, but not SETDB1,

Marnet et al.

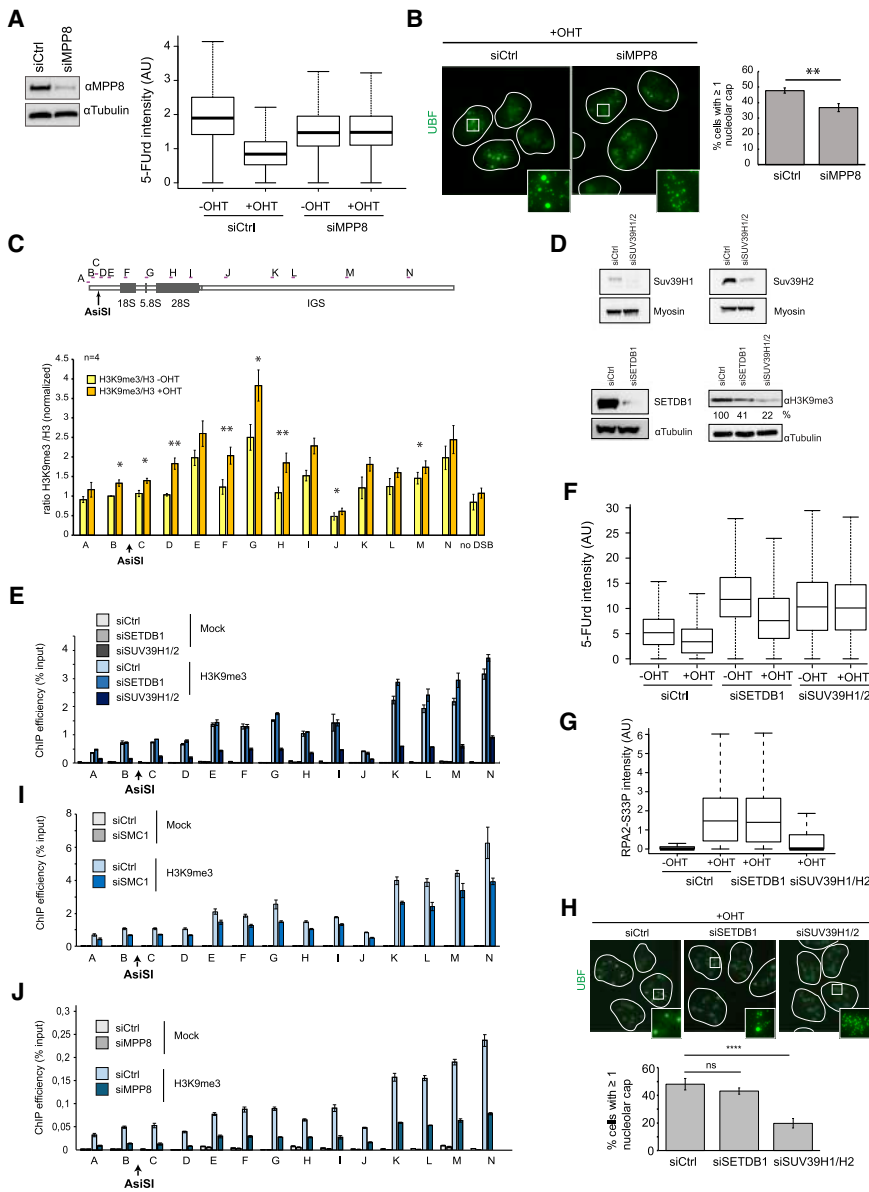


Figure 6. The HUSH complex mediates transcriptional shutdown after DSB via H3K9me3 deposition. (A, left panel) Western blot using MPP8 and tubulin antibodies in control or MPP8 siRNA transfected DivA cells. (Right panel) 5-FUrd level as measured by high-content microscopy (>5000 cells) in untreated or OHT-treated DivA transfected with either control or MPP8 siRNA (as indicated). A representative experiment is shown. (B) UBF staining was performed following OHT treatment in control or MPP8-depleted cells as indicated. The left panel shows representative images, and the right panel shows the number of cells displaying at least one nucleolar cap. The mean and SD from four independent experiments are shown. (**) $P < 0.01$. (C) ChIP-qPCR was performed in untreated or OHT-treated DivA cells using antibodies against H3K9me3 and H3. The mean and SEM of the ratio H3K9me3/H3 from four independent experiments are shown. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$. (D) Western blots showing the level of SUV39H1 (top left), SUV39H2 (top right), or SETDB1 (bottom left) upon transfection of indicated siRNA as well as their influence on H3K9me3 levels (bottom right). (E) ChIP against H3K9me3 was performed in control, SETDB1, and SUV39H1/2 siRNA transfected untreated DivA cells as indicated. ChIP efficiency (percentage of input) of a representative experiment is shown. (F) Representative box plot of 5-FUrd level as measured by high-content microscopy (>2000 cells) in untreated or OHT-treated DivA transfected with either control, SETDB1, or SUV39H1/2 siRNA (as indicated). (G) Box plots of RPA2-S33P nucleolar intensity after depletion of SETDB1 or SUV39H1/2 followed by 4 h of OHT treatment in DivA cells. A representative experiment is shown (>100 cells). (H) UBF staining was performed following OHT treatment in control, SETDB1-depleted, or

SUV39H1/2-depleted cells as indicated. Representative images are shown (left panel), and the number of cells displaying at least one nucleolar cap was quantified (right panel). The mean and SD from four independent experiments are shown. (ns) Nonsignificant; (***) $P < 0.0001$. (I) ChIP against H3K9me3 was performed in control and SMC1 siRNA transfected untreated DivA cells as indicated. ChIP efficiency (percentage of input) of a representative experiment is shown. (J) ChIP against H3K9me3 was performed in control and MPP8 siRNA transfected untreated DivA cells as indicated. ChIP efficiency (percentage of input) of a representative experiment is shown.

impaired DSB-induced transcription repression (Fig. 6F; Supplemental Fig. S6F), resection (Fig. 6G), and cap formation (Fig. 6H) without cell cycle changes (Supplemental Fig. S6G). Of importance, depletion of SMC1 or MPP8 also triggered decreased levels of H3K9me3 at rDNA (Fig. 6I, J), further strengthening the role of cohesin and the HUSH complex in mediating H3K9me3 deposition.

Collectively, these data suggest that following DSB production in rDNA, the cohesin complex mediates transcriptional shutdown of ribosomal genes in a manner that depends on the HUSH complex and SUV39H1/2-mediated H3K9me3.

The LINC complex subunit SUN1, the actin nucleator ARP3, and the myosin regulator UNC-45A promote DSB mobilization downstream from transcriptional repression

We next aimed at characterizing the mechanisms that ensure rDNA DSB mobilization at the periphery. Previous studies in yeast and mammals showed a role for the microtubule network in the movement of DSBs (Lotterberger et al. 2015; Lawrimore et al. 2017; Oshidari et al. 2018). However, a pretreatment with the microtubule-destabilizing drug nocodazole did not decrease the

formation of nucleolar caps (Supplemental Fig. S7A,B). We next focused our attention on the LINC complex, which is embedded in the NE and mediates connections between the nucleoskeleton and the cytoskeleton. Indeed, the LINC complex plays roles in mobilization of damaged telomeres and IR-induced DSBs in mouse cells (Lotterberger et al. 2015) and also contributes to DSBs clustering in human nuclei (Aymard et al. 2017). Interestingly, SUN1, a subunit of the LINC complex localizing to the NE, was also reported recently to be present in nucleoli (Matsumoto et al. 2016; Moujaber et al. 2017). In agreement, we could indeed confirm that SUN1 forms patches close to RNA Pol I (Supplemental Fig. S7C; Sup-

plemental Movie S2). Closer inspection revealed that SUN1-stained NE frequently forms invaginations that connect the nucleolus (Fig. 7A; Supplemental Fig. S7D). Neither DSB production nor actinomycin D treatment affected the number of NE invaginations, as observed using a Lamin B staining (Supplemental Fig. S7E,F; Supplemental Movie S3). However, SUN1 depletion decreased both invaginations and cap formation following rDNA DSB induction (Fig. 7B; Supplemental Fig. S7G), without affecting cell cycle distribution (Supplemental Fig. S7H), suggesting that the LINC complex contributes to rDNA mobilization in a manner that involves NE invaginations.

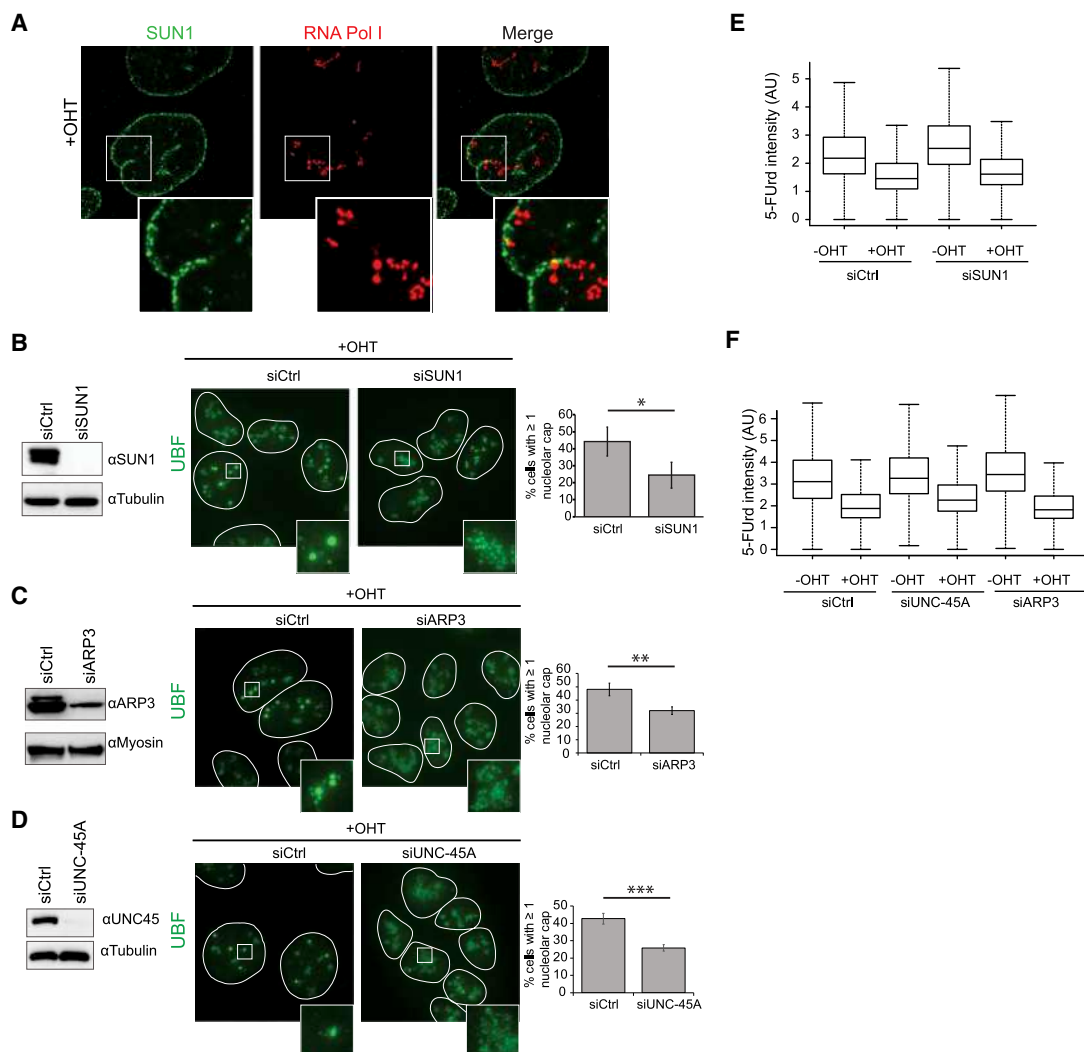


Figure 7. The LINC complex, ARP3, and UNC-45A mediate rDNA DSB mobilization at the nucleolar periphery. (A) Example of NE invagination (SUN1 in green) connecting the nucleolus (RNA Pol I in red); a magnification is shown at the *bottom*. (B, *left panel*) Western blot using SUN1 and tubulin antibodies in control or SUN1 siRNA transfected DivA cells. (*Middle panel*) Representative image of UBF staining in OHT-treated DivA cells in control or SUN1-depleted cells. (*Right panel*) The number of cells displaying at least one nucleolar cap. The mean and SD from three independent experiments are shown. (*) $P < 0.05$. (C) Same as in B, except that a siRNA against ARP3 was used. The mean and SD from three independent experiments are shown. (**) $P < 0.01$. (D) Same as in B, except that a siRNA against UNC-45A was used. The mean and SD from five independent experiments are shown. (***) $P < 0.001$. (E) 5-FUrd level measured by high-content microscopy (>5000 cells) in untreated or OHT-treated DivA transfected with either control or SUN1 siRNA (as indicated). A representative experiment is shown. (F) Same as in E, except that siRNA against ARP3 and UNC-45A were used. A representative experiment is shown.

Marnet et al.

Interestingly, persistent and heterochromatic DSBs were shown to move toward the NE in yeast and *Drosophila* cells, respectively (Horigome et al. 2014; Ryu et al. 2015), via nuclear actin polymerization in *Drosophila* (Caridi et al. 2018). We hence further asked whether rDNA DSB mobilization also necessitates the actin network. Indeed, depletion of UNC-45A (also known as general cell UNC-45 [GC-UNC-45], a myosin regulator) (Lehtimäki et al. 2017) and ARP3 (an actin nucleator-mediating branched actin network), both previously involved in heterochromatic DSB mobilization in flies (Caridi et al. 2018), also decreased DSB-induced cap formation (Fig. 7C,D) without major changes to cell cycle distribution (Supplemental Fig. S7H). Strikingly, depletion of all three factors (SUN1, UNC-45A, and ARP3) did not affect transcriptional repression following DSB induction (Fig. 7E,F; Supplemental Fig. S7I). Collectively, these data suggest that the NE/LINC complex and actin network (ARP3 and UNC-45A) ensure rDNA DSB mobilization outside of the nucleolus downstream from transcriptional inhibition.

Discussion

The rDNA is one of the most fragile loci on the genome and is also particularly prone to experience major rearrangements during replication and repair (Lindström et al. 2018). Highly specialized repair mechanisms are likely implemented in order to ensure its stability across cell divisions. Here we uncovered that repair of DSBs produced on the rDNA requires transcriptional extinction via a cohesin/HUSH-dependent pathway, followed in S/G2 cells by end resection in the interior of the nucleolus. Resected DNA ends are further mobilized at the nucleolar periphery, where they undergo HR repair and accumulation of γ H2AX, MDC1, and ubiquitin chains. Interestingly, a recent study reported that the Nbs1 component of the MRN complex as well as low levels of γ H2AX signal can nevertheless be observed within the interior of the nucleolus following rDNA break induction (Korsholm et al. 2019). Moreover, ATM activation following DSB in rDNA precedes DSB mobilization (this study; Harding et al. 2015; Korsholm et al. 2019). Hence, altogether, this suggests that while DSB signaling by PI3 kinases can take place at the interior of the nucleolus, signaling is further amplified at the periphery of the nucleolus once resection has occurred, in agreement with our recent findings that γ H2AX accumulates more at DSBs repaired by HR (Clouaire et al. 2018).

Of importance, we further found that the NE forms invaginations that connect the nucleolus and that both the LINC complex and the actin network contribute to rDNA DSB mobilization (Supplemental Fig. S8).

Uncoupling DSB mobilization from transcriptional repression in the context of rDNA damage

In agreement with previous studies using either the CRISPR/Cas9 or the I-PpoI homing endonuclease to in-

duce DSBs on the rDNA array, we showed that AsiSI-induced rDNA breaks trigger both rDNA transcriptional arrest and nucleolar segregation as visualized by cap formation (i.e., DSB movement) (Larsen et al. 2014; Harding et al. 2015; van Sluis and McStay 2015; Pefani et al. 2018). However, as opposed to CRISPR/Cas9- or I-PpoI-mediated breaks that promote nucleolar segregation across all cell cycle stages, caps are rather restricted to S/G2 cells when induced by AsiSI despite comparable levels of DSB formation and transcriptional repression that were observed throughout the cell cycle. We could further verify that nucleolar segregation occurred in nearly all cells following (1) actinomycin D treatment, (2) CRISPR/Cas9-mediated cleavage induced using nanoblades (Mangeot et al. 2019), and (3) AsiSI activation in presence of an inhibitor of DNA-PK that strongly blocks AsiSI DSB repair (Supplemental Fig. S1E–H; Caron et al. 2015). This indicated that, in principle, DivA cells are able to undergo robust nucleolar segregation and that blocking AsiSI DSB repair somehow mimics CRISPR/Cas9- or I-PpoI-induced rDNA cleavage. In addition, we showed that DSBs produced by AsiSI elsewhere on the genome do not compete with the rDNA response, since CRISPR/Cas9-induced breaks on the rDNA also triggered robust nucleolar segregation in the presence of activated AsiSI (Supplemental Fig. S1I,J). Altogether, this suggests that the milder phenotypes observed upon AsiSI-mediated breakage compared with Cas9-mediated break induction—both transcriptional repression (data not shown) and nucleolar cap formation (Supplemental Fig. S1)—could be due to either a lower amount of rDNA copies cleaved by AsiSI (sensitive to DNA methylation) compared with Cas9 and/or discrepancies in repair efficiency. Of note, recent work on CRISPR/Cas9-induced DSBs suggested that such breaks are particularly refractory to repair (Brinkman et al. 2018) and may be handled by the Fanconi anemia pathway (Richardson et al. 2018). In addition, in contrast to type II restriction enzyme (such as AsiSI), the I-PpoI homing endonuclease recognizes particularly long DNA sequences in a manner that severely bends and alters the DNA structure (Chevalier and Stoddard 2001), which may also affect repair efficiency. Altogether, we propose that the inherent persistent nature of CRISPR/Cas9- or I-PpoI-induced breaks may hence account for the extreme nucleolar segregation and HR usage reported previously at all cell cycle stages (van Sluis and McStay 2015) and that the restriction of DSB movement to S and G2 cells is a bona fide rDNA DSB response.

DSB mobilization at the nucleolar periphery has been proposed previously to be a direct consequence of DSB-induced rDNA transcriptional extinction (van Sluis and McStay 2015). Indeed, the nucleolus is a self-organizing membrane-free organelle in which rRNAs act as seeds initiating a phase separation process leading to nucleolus formation (Falahati et al. 2016). Extinction of rDNA transcription rapidly triggers a drastic reorganization in which rDNA is expelled at the periphery by a phase separation event (as observed with actinomycin D). However, our findings indicate that rDNA DSB mobilization at the nucleolar periphery is not only a consequence of a phase

separation driven by rDNA transcriptional arrest. Indeed, DSBs are mobilized only in S/G2 stage, while transcriptional repression occurs throughout the cell cycle. Moreover, depletion of the LINC/actin pathway impairs mobilization without affecting the upstream transcriptional inhibition. Of note, this rDNA mobilization pathway is specific to DSB formation, since depletion of SMC1, Suv39H1/2, Sun1, UNC45, and Arp3 did not affect rDNA segregation observed after actinomycin D (data not shown). Importantly, so far, we could not identify any conditions under which transcriptional arrest is impaired and DSBs are still mobilized, which might suggest that transcriptional repression is a prerequisite for DSB movement.

Mechanisms ensuring DSB mobilization: NE invagination, LINC, and the actin network

Interestingly, the mobilization of rDNA DSBs shares common features with the mobilization of those induced in heterochromatin and active genes and of persistent DSBs. First, in mammals, DSBs induced in pericentromeric heterochromatin display relocalization to the periphery of the heterochromatin focus during S/G2 in a manner that depends on resection (Tsouroula et al. 2016), as shown here for a DSB induced in rDNA. Second, in *Drosophila*, heterochromatic DSBs move toward the periphery of the heterochromatic focus and further to the NE in a manner that depends on Suv39H1-mediated H3K9me3, on the LINC complex, and on the actin network (Chiolo et al. 2011; Ryu et al. 2015; Colmenares et al. 2017; Caridi et al. 2018). Third, studies in yeast have shown that persistent DSBs are relocalized to the NE via the SUN domain-containing proteins Mps3 or Sad1 (Oza et al. 2009; Horigome et al. 2014; Swartz et al. 2014). Fourth, we reported previously that both the actin network and the LINC complex contribute to clustering of DSBs induced in active genes in G1 (Aymard et al. 2017). Of importance all of the above-mentioned DSBs were described previously as refractory to fast repair (for review, see Marnef et al. 2017; Fortuny and Polo 2018). We thus propose that breaks in rDNA may also display impaired or delayed repair kinetics—in line with its repetitive nature, high RNA Pol I occupancy, and prevalence of secondary structures (R loops and G4)—and hence use similar mobilization pathways to undergo safe repair.

Notably, while the interaction of persistent DSBs with the NE has been reported in *Drosophila* and yeast, there was no evidence of such phenomena in mammals despite a reported function of the LINC complex in DSB repair (Lottersberger et al. 2015; Aymard et al. 2017). Here we report that the NE forms invaginations that contact the nucleolus (in line with previous reports showing strong relationship with the NE and nucleolus) (Hernandez-Verdun et al. 2010) and that depletion of the LINC complex, which reduces NE invaginations (Supplemental Fig. S7), also affects rDNA DSB relocalization to the nucleolus periphery. Hence, our data suggest that NE/persistent DSB anchorage also occur in mammals and that, for rDNA breaks, this interaction contributes to

the localization of the DSB at the nucleolar periphery. Alternatively, or in addition, the LINC complex and NE invaginations could also directly regulate resection, which could further foster DSB mobilization to the periphery of the nucleolus.

Our data also indicate that rDNA movement relies on the actin network, as reported for *Drosophila* heterochromatic breaks (Caridi et al. 2018) and in line with the contribution of actin regulation in DSB repair (Belin et al. 2015; Spichal et al. 2016; Aymard et al. 2017; Schrank et al. 2018). One possibility is that rDNA DSB mobilization involves the formation of nuclear/nucleolar actin filaments as found in other contexts (Belin et al. 2015; Caridi et al. 2018; Schrank et al. 2018). Alternatively, since cytoplasmic filamentous actin can be found in NE invaginations (Jorgens et al. 2017), one could envisage that cytoplasmic actin cables/filaments regulate NE deformation and the dynamics of invaginations, which could further contribute to the relocalization of the rDNA DSBs outside of the nucleolus thanks to a physical link between the DSBs and NE-embedded LINC complex. Altogether our data suggest that a conserved mechanism involving the LINC complex and the actin network probably exists to mobilize all “persistent” or “difficult to repair” DSBs to the NE, providing a safe recombination environment.

Cohesin/HUSH/H3K9me3-driven DSB-induced rDNA transcriptional repression

DSB-induced rDNA transcriptional repression has been shown to require ATM activity, Nbs1 (our data not shown; Kruhlak et al. 2007; Larsen et al. 2014; Harding et al. 2015; van Sluis and McStay 2015; Warmerdam et al. 2016; Pefani et al. 2018), and, more recently, the MST2-dependent phosphorylation of H2B on Ser14 (Pefani et al. 2018). Here we found that the cohesin complex also regulates RNA Pol I transcription in response to DSBs. Interestingly, conserved mechanisms may account for RNA Pol I and Pol II regulation in *cis* to DSBs, since both ATM and the cohesin complex were identified as key players in RNA Pol II transcriptional arrest in *cis* to DSBs (Shanbhag et al. 2010; Meisenberg et al. 2019). This raises the interesting possibility that ATM may regulate transcription at least in part by regulating the cohesin biology in *cis* to DSBs, as the cohesin complex is an ATM target (Kim et al. 2002). Our data also indicate that the HUSH complex, shown previously to display H3K9me3 methylation activity (Tchakovnikarova et al. 2015; Liu et al. 2018; Robbez-Masson et al. 2018), participates in DSB-induced RNA Pol I transcriptional repression. Notably, SUV39H1, SETDB1, and also the histone demethylase KDM4A, all known to regulate H3K9me3 levels, have been involved in DSB repair by HR (Chiolo et al. 2011; Ayrappetov et al. 2014; Alagoz et al. 2015; Colmenares et al. 2017), and loss of H3K9me3 triggers aberrant recombination between repetitive sequence (Peng and Karpen 2007). On the other hand, the cohesin complex is a key regulator of HR; it prevents the end joining of distant DSB ends (for review, see Dorsett and Ström 2012; Gelot et al. 2016b) and suppresses

Marnet et al.

aberrant recombination at rDNA (Kobayashi et al. 2004; Kobayashi and Ganley 2005). Our study provides a mechanistic link between the cohesin complex and the regulation of H3K9me3 levels and suggests that cohesin contributes to the regulation of H3K9me3 levels by recruiting the HUSH complex, further allowing transcriptional repression, resection, and DSB mobilization for recombination.

In summary, here we report that as for heterochromatic DSBs, rDNA DSB repair relies on a spatiotemporal separation, where resection within the nucleolus is followed by the mobilization of the break outside its environment. Since mobilization involves players also required for the relocalization of other “persistent” DSBs such as the LINC complex, our data suggest that conserved DSB mobilization-dependent mechanisms exist from yeast to humans in order to relocate harmful breaks to a NE compartment, allowing safe repair.

Materials and methods

Cell culture and treatments

DivA cells were grown in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen) in the presence of 1 μ g/mL puromycin (Invivogen). Unless stated otherwise, DSBs were induced by the addition of 300 nM OHT (Sigma, H7904) for 4 h. For DNA-PK inhibition, 2 μ M NU7441 (Selleckchem) was added 1 h prior to OHT addition and maintained during the OHT-mediated break induction. When indicated, 100 ng/mL actinomycin D (Sigma) was added to cells for a total of 1 h. Nocodazole (3 μ M) was added 1 h prior to OHT addition. siRNA-mediated depletion of proteins (Supplemental Table S1) was performed using the cell line Nucleofector kit V (Program X-001, Amaxa) according to the manufacturer’s instructions. Details for CRISPR–Cas9-induced breakage and cell synchronization are in the Supplemental Material.

BLESS analysis on rDNA

BLESS sequences from asynchronized cells or G1 and G2 cell populations were retrieved from our previous work (Aymard et al. 2017; Clouaire et al. 2018; Mourad et al. 2018). Barcodes were removed using Cutadapt, and BLESS data were aligned on a custom-built genome composed of hg19 plus rRNA unit U13369.1 from GenBank using bwa in paired-end mode (bwa aln and bwa sampe). Fragments were reconstituted from paired reads using Rsamtools and GenomicAlignments (R packages). Fragments with lengths >500 bp were dropped, and the remaining fragments were deduplicated (fragments with the exact same start and end positions were considered as duplicates). For the G1 and G2 BLESS data analysis, proximal positions were extracted from fragments based on their relative positions to the DSB.

Immunofluorescence

Cells were plated on glass coverslips and fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 20 min, permeabilized in 0.5% Triton X-100/PBS for 5 min unless stated otherwise (Supplemental Table S2), and blocked with 3% BSA/PBS for 30 min before incubation with primary antibodies (see Supplemental Table S2) in 3% BSA/PBS overnight at 4°C. For CSK pre-extraction, cells were permeabilized using 0.5% Triton X-100 for 5 min followed by 10 min in

CSK buffer (100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM PIPES at pH 6.8), fixation in 4% PFA/PBS, and blocking with 3% BSA/PBS. For buffer II pre-extraction (20 mM NaCl, 0.5% NP-40, 20 mM HEPES at pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT), buffer II was added to cells for 20 min on ice followed by fixation in 4% PFA/PBS and blocking with 3% BSA/PBS. The appropriate Alexa-conjugated secondary antibodies diluted in 3% BSA/PBS (mouse or rabbit Alexa 594 or Alexa 488 used at a 1:1000 dilution [Invitrogen]) were then added to cells for 1 h at room temperature followed by DAPI or Hoechst 33342 staining. Coverslips were mounted in Citifluor (Citifluor, AF-1), and images were acquired using a wide-field microscope (Leica, DM6000) equipped with a cooled charge-coupled device camera (CoolSNAP HQ2) using 40 \times or 100 \times objectives and MetaMorph.

Images of total RPA and SUN1 immunostainings were processed by nonlinear deconvolution with Huygens software (Scientific Volume Imaging). Classical maximum likelihood estimation was used to estimate positive fluorescent signal after deconvolution. An adaptive estimation of background was done for each image, the signal to noise ratio was set to 40 (RPA) or 20 (SUN1), and 50 iterations were used during the minimization.

For superresolution microscopy, we imaged cells using a fast structure illumination microscopy (SIM) setup with a binary phase optical modulator (QXGA SLM Fourth Dimension) under a 100 \times objective lens (CFI SR APO 100XH ON 1,49 DT 0,12 Nikon) mounted on a Nikon Eclipse Ti-E and a Hamamatsu SCAMOS camera (ORCA FLASH4.0 LT). A series of 800 3D Speckle illuminations was made on the object plane thanks to the random phase modulation from the SLM conjugate with the pupil plane of the microscope objective. A 150-nm Z interval was acquired on each image. Superresolution images were processed by a joint reconstruction strategy using random speckle illuminations (Negash et al. 2016; Labouesse et al. 2017). A positivity constraint was applied based on the realistic hypothesis that the fluorescent signal was only positive.

Quantifications of immunofluorescence

For DSB mobilization, the number of cells displaying at least one nucleolar cap was counted manually using the 40 \times objective in >150 cells per experiments and for a minimum of three independent experiments using either RNA pol I or UBF as markers. The number of caps (RNA Pol I staining) per nucleus was counted manually in >80 cells. Resection was quantified using RPAS33P antibody in >100 cells acquired with a 40 \times objective and analyzed using Columbus software (Perkin Elmer). Nucleoli were detected thanks to the RNA Pol I (using method A), and the sum of RPA2S33 spot (method D) intensity inside the nucleolar region was determined. At least three independent experiments were performed; only one representative experiment is shown as a box plot. In Supplemental Figure S3F, the presence of repair protein in either unsegregated or segregated nucleoli was quantified in cells with at least one nucleolar cap. The number of invaginations per cell was quantified manually using Lamin B1 staining in >70 cells and in three independent experiments.

High-throughput microscopy

The Operetta automated high-content screening microscope (PerkinElmer) was used for the rDNA transcription and/or cell cycle analyses. DivA cells were plated in 96-well plates and treated with OHT for 4 h. For the visualization of nascent rRNA synthesis, 2 mM 5-FUrd (Sigma) was added 20–40 min before the end of the OHT treatment. For the detection of S-phase cells, EdU was added 10–20 min prior to the end of the OHT treatment. Cells

were fixed and permeabilized as mentioned above, and saturation was done in 1% BSA/PBS for 30 min. For EdU-treated cells, a Click-iT reaction (Alexa 488, Invitrogen) was performed according to the manufacturer's instruction before the addition of an anti-BrdU primary antibody (BU-33; Sigma) at 1:500 in 1% BSA/PBS in the presence of 160 U/m RNasinL (Promega) overnight at 4°C. Secondary antimouse Alexa 647 (1:500 in 1% BSA/PBS; Molecular Probes, A21235) was incubated for 30 min at 37°C in the presence of 80 U/m RNasinL followed by DAPI staining. Image acquisition with a 20× objective lens was automated to obtain at least 36 fields per well, allowing the visualization of a total of >1000 cells (three wells were acquired for each condition). Each picture was analyzed with the integrated Columbus software. Briefly, the DAPI-stained nuclei were selected (method B), and the size and roundness of nuclei were used as parameters to eliminate false positive compounds. The 5-FUrd staining attributed to the nucleoli was delineated using the find spot method D, and the sum of the 5-FUrd intensity was measured and is represented as box plots. For cell cycle analysis, the sum of the DAPI intensity and the mean of the EdU intensity were plotted in order to separate G1, S, and G2 cells. The sum of the 5-FUrd intensity was subsequently determined in each of these cell population.

ChIP

ChIP experiments were performed as in Iacovoni et al. (2010). The amount of chromatin and antibodies used are detailed in Supplemental Table S2. ChIP efficiencies were calculated as a percentage of input of DNA immunoprecipitated. For quantitative PCR (qPCR) analyses, the input as well as immunoprecipitation samples were analyzed with the primers listed in Supplemental Table S3. For Supplemental Figs. 3E and S6C, ChIP efficiencies (percentage of input) obtained with each primer pair were further normalized to the value obtained for primer B in the undamaged condition. The ratio of H3K9m3 over H3 was calculated before normalization with primer B for Figure 6C.

DNA FISH combing and analysis

The combing and FISH probing of the rDNA fibers were carried out before or after 24 h of OHT treatment (Genomic Vision). The detection and rDNA fibers and the attribution of rDNA-specific probes (Caburet et al. 2005) was carried out using Genomic Vision's provided Web interface. Analysis of rearrangements was performed using a script that was designed to count the total number of units (as defined when comprised between two "IGS" regions) and assess the occurrence of changes when comparing one unit with the next. The source code was deposited on GitHub (https://github.com/LegubeDNAREPAIR/rDNA/blob/master/get_break_event.py).

Western blotting

Cells were incubated in RIPA buffer (0.5% deoxycholate, 1% NP-40, 50 mM Tris at pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS) for 20 min on ice and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min before SDS loading buffer addition to the supernatant. In the case of H3 and H3K9me3 immunoblots, cells were sonicated three times for 10 sec in lysis buffer (1% SDS, 1% Triton, 10 mM Tris at pH 7.5, 450 mM NaCl) before the addition of SDS loading buffer. Protein extracts were resolved on 3%–8% NuPAGE Tris-acetate gels or 4%–12% Bis-Tris (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and transferred onto PVDF membranes (Invitrogen). The latter were blocked in TBS containing 0.1% Tween 20 (Sigma) and 3% nonfat dry milk for 1 h followed by an over-

night incubation at 4°C with primary antibodies (Supplemental Table S2). The appropriate horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies were used to reveal the proteins (antimouse at 1:10,000 [Sigma, A2554] and antirabbit at 1:10,000 [Sigma, A0545]) using a luminol-based enhanced chemiluminescence HRP substrate (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific).

Acknowledgments

We thank T. Clouaire and N. Puget for their advice throughout the project and comments on the manuscript. We thank E. Watrin (Rennes) for the Flag-GFP-SMC1 construct. We thank the high-throughput microscopy platform of the Centre de Biologie Intégrative (Toulouse), and the mass spectrometry platform from the Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (Toulouse). Funding in E.P.R.'s laboratory was provided by Labex Ecofect (ANR-11-LABX-0048), Fondation Innovations en Infectiologie (Finovi), and the European Research Council (ERC-StG-LS6-805500) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programs. Funding in G.L.'s laboratory was provided by grants from the European Research Council (ERC-2014-CoG 647344), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-14-CE10-0002-01 and ANR-13-BSV8-0013), the Institut National Contre le Cancer (INCA), and the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC).

Author contributions: A.M., A.-L.F., C.A., V.D., and E.G. performed experiments. V.R. performed bioinformatic analyses of BLESS data sets. T.M. performed superresolution microscopy. P.E.M. and E.P.R. provided nanoblades for CRISPR/Cas9-induced breakage. A.M. and G.L. conceived, supervised, and analyzed experiments. A.M. and G.L. wrote the manuscript. All authors commented and edited the manuscript.

References

- Alagoz M, Katsuki Y, Ogiwara H, Ogi T, Shibata A, Kakarougkas A, Jeggo P. 2015. SETDB1, HP1 and SUV39 promote repositioning of 53BP1 to extend resection during homologous recombination in G2 cells. *Nucleic Acids Res* **43**: 7931–7944. doi:10.1093/nar/gkv722
- Aymard F, Bugler B, Schmidt CK, Guillou E, Caron P, Briois S, Iacovoni JS, Daburon V, Miller KM, Jackson SP, et al. 2014. Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 366–374. doi:10.1038/nsmb.2796
- Aymard F, Aguirrebengoa M, Guillou E, Javierre BM, Bugler B, Arnould C, Rocher V, Iacovoni JS, Biernacka A, Skrzypczak M, et al. 2017. Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes. *Nat Struct Mol Biol* **24**: 353–361. doi:10.1038/nsmb.3387
- Ayrappetov MK, Gursoy-Yuzugullu O, Xu C, Xu Y, Price BD. 2014. DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 9169–9174. doi:10.1073/pnas.1403565111
- Belin BJ, Lee T, Mullins RD. 2015. DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin-2 and Spire-1/2 that promotes efficient DNA repair. *Elife* **4**: e07735. doi:10.7554/eLife.07735
- Bordelet H, Dubrana K. 2019. Keep moving and stay in a good shape to find your homologous recombination partner. *Curr Genet* **65**: 29–39. doi:10.1007/s00294-018-0873-1

Marnet et al.

- Brinkman EK, Chen T, de Haas M, Holland HA, Akhtar W, van Steensel B. 2018. Kinetics and fidelity of the repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks. *Mol Cell* **70**: 801–813.e6. doi:10.1016/j.molcel.2018.04.016
- Caburet S, Conti C, Schurra C, Lebofsky R, Edelstein SJ, Bensimon A. 2005. Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. *Genome Res* **15**: 1079–1085. doi:10.1101/gr.3970105
- Caridi CP, D'Agostino C, Ryu T, Zapotoczny G, Delabaere L, Li X, Khodaverdian VY, Amaral N, Lin E, Rau AR, et al. 2018. Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature* **559**: 54–60. doi:10.1038/s41586-018-0242-8
- Caron P, Aymard F, Iacovoni JS, Briosis S, Canitrot Y, Bugler B, Massip L, Losada A, Legube G. 2012. Cohesin protects genes against γ H2AX Induced by DNA double-strand breaks. *PLoS Genet* **8**: e1002460. doi:10.1371/journal.pgen.1002460
- Caron P, Choudhary J, Clouaire T, Bugler B, Daburon V, Aguirrebengoa M, Mangeat T, Iacovoni JS, Álvarez-Quilón A, Cortés-Ledesma F, et al. 2015. Non-redundant functions of ATM and DNA-PKcs in response to DNA double-strand breaks. *Cell Rep* **13**: 1598–1609. doi:10.1016/j.celrep.2015.10.024
- Chevalier BS, Stoddard BL. 2001. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res* **29**: 3757–3774. doi:10.1093/nar/29.18.3757
- Chiolo I, Minoda A, Colmenares SU, Polyzos A, Costes SV, Karpen GH. 2011. Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* **144**: 732–744. doi:10.1016/j.cell.2011.02.012
- Clouaire T, Legube G. 2015. DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision? *Nucleus* **6**: 107–113. doi:10.1080/19491034.2015.1010946
- Clouaire T, Rocher V, Lashgari A, Arnould C, Aguirrebengoa M, Biernacka A, Skrzypczak M, Aymard F, Fongang B, Dojer N, et al. 2018. Comprehensive mapping of histone modifications at DNA double-strand breaks deciphers repair pathway chromatin signatures. *Mol Cell* **72**: 250–262.e6. doi:10.1016/j.molcel.2018.08.020
- Colmenares SU, Swenson JM, Langley SA, Kennedy C, Costes SV, Karpen GH. 2017. *Drosophila* histone demethylase KDM4A has enzymatic and non-enzymatic roles in controlling heterochromatin integrity. *Dev Cell* **42**: 156–169.e5. doi:10.1016/j.devcel.2017.06.014
- Crossetto N, Mitra A, Silva MJ, Bienko M, Dojer N, Wang Q, Karaca E, Chiarle R, Skrzypczak M, Ginalski K, et al. 2013. Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods* **10**: 361–365. doi:10.1038/nmeth.2408
- Dorsett D, Ström L. 2012. The ancient and evolving roles of cohesin in gene expression and DNA repair. *Curr Biol* **22**: R240–R250. doi:10.1016/j.cub.2012.02.046
- Falahati H, Pelham-Webb B, Blythe S, Wieschaus E. 2016. Nucleation by rRNA dictates the precision of nucleolus assembly. *Curr Biol* **26**: 277–285. doi:10.1016/j.cub.2015.11.065
- Floutsakou I, Agrawal S, Nguyen TT, Seoighe C, Ganley ARD, McStay B. 2013. The shared genomic architecture of human nucleolar organizer regions. *Genome Res* **23**: 2003–2012. doi:10.1101/gr.157941.113
- Fortuny A, Polo SE. 2018. The response to DNA damage in heterochromatin domains. *Chromosoma* **127**: 291–300. doi:10.1007/s00412-018-0669-6
- Franek M, Kovaříková A, Bártová E, Kozubek S. 2016. Nucleolar reorganization upon site-specific double-strand break induction. *J Histochem Cytochem* **64**: 669–686. doi:10.1369/0022155416668505
- Frohns A, Frohns F, Naumann SC, Layer PG, Löbrich M. 2014. Inefficient double-strand break repair in murine rod photoreceptors with inverted heterochromatin organization. *Curr Biol* **24**: 1080–1090. doi:10.1016/j.cub.2014.03.061
- Gelot C, Guirouilh-Barbat J, Le Guen T, Dardillac E, Chailleux C, Canitrot Y, Lopez BS. 2016a. The cohesin complex prevents the end joining of distant DNA double-strand ends. *Mol Cell* **61**: 15–26. doi:10.1016/j.molcel.2015.11.002
- Gelot C, Guirouilh-Barbat J, Lopez BS. 2016b. The cohesin complex prevents the end-joining of distant DNA double-strand ends in S phase: consequences on genome stability maintenance. *Nucleus* **7**: 339–345. doi:10.1080/19491034.2016.1194159
- Goodarzi AA, Kurka T, Jeggo PA. 2011. KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 831–839. doi:10.1038/nsmb.2077
- Guénolé A, Legube G. 2017. A meeting at risk: unrepaired DSBs go for broke. *Nucleus* **8**: 589–599. doi:10.1080/19491034.2017.1380138
- Harding SM, Boiarsky JA, Greenberg RA. 2015. ATM dependent silencing links nucleolar chromatin reorganization to DNA damage recognition. *Cell Rep* **13**: 251–259. doi:10.1016/j.celrep.2015.08.085
- Herdman C, Mars J-C, Stefanovsky VY, Tremblay MG, Sabourin-Felix M, Lindsay H, Robinson MD, Moss T. 2017. A unique enhancer boundary complex on the mouse ribosomal RNA genes persists after loss of Rrn3 or UBF and the inactivation of RNA polymerase I transcription. *PLoS Genet* **13**: e1006899. doi:10.1371/journal.pgen.1006899
- Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DLJ. 2010. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**: 415–431. doi:10.1002/wrna.39
- Horigome C, Oma Y, Konishi T, Schmid R, Marcomini I, Hauer MH, Dion V, Harata M, Gasser SM. 2014. SWR1 and INO80 chromatin remodelers contribute to DNA double-strand break perinuclear anchorage site choice. *Mol Cell* **55**: 626–639. doi:10.1016/j.molcel.2014.06.027
- Iacovoni JS, Caron P, Lassadi I, Nicolas E, Massip L, Trouche D, Legube G. 2010. High-resolution profiling of γ H2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J* **29**: 1446–1457. doi:10.1038/emboj.2010.38
- Jakob B, Splinter J, Conrad S, Voss K-O, Zink D, Durante M, Löbrich M, Taucher-Scholz G. 2011. DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res* **39**: 6489–6499. doi:10.1093/nar/gkr230
- Jorgens DM, Inman JL, Wojcik M, Robertson C, Palsdottir H, Tsai W-T, Huang H, Bruni-Cardoso A, López CS, Bissell MJ, et al. 2017. Deep nuclear invaginations are linked to cytoskeletal filaments - integrated bioimaging of epithelial cells in 3D culture. *J Cell Sci* **130**: 177–189. doi:10.1242/jcs.190967
- Kakarougkas A, Ismail A, Chambers AL, Riballo E, Herbert AD, Künzel J, Löbrich M, Jeggo PA, Downs JA. 2014. Requirement for PBAF in transcriptional repression and repair at DNA breaks in actively transcribed regions of chromatin. *Mol Cell* **55**: 723–732. doi:10.1016/j.molcel.2014.06.028
- Kim S-T, Xu B, Kastan MB. 2002. Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev* **16**: 560–570. doi:10.1101/gad.970602

- Kobayashi T, Ganley ARD. 2005. Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science* **309**: 1581–1584. doi:10.1126/science.1116102
- Kobayashi T, Horiuchi T, Tongaonkar P, Vu L, Nomura M. 2004. SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rRNA genes in yeast. *Cell* **117**: 441–453. doi:10.1016/S0092-8674(04)00414-3
- Korsholm LM, Gál Z, Lin L, Quevedo O, Ahmad DA, Dulina E, Luo Y, Bartek J, Larsen DH. 2019. Double-strand breaks in ribosomal RNA genes activate a distinct signaling and chromatin response to facilitate nucleolar restructuring and repair. *Nucleic Acids Res* doi:10.1093/nar/gkz518
- Kruhlak M, Crouch EE, Orlov M, Montañó C, Gorski SA, Nussenzweig A, Misteli T, Phair RD, Casellas R. 2007. The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks. *Nature* **447**: 730–734. doi:10.1038/nature05842
- Labouesse S, Negash A, Idier J, Bourguignon S, Mangeat T, Liu P, Sentenac A, Allain M. 2017. Joint reconstruction strategy for structured illumination microscopy with unknown illuminations. *IEEE Trans Image Process* **26**: 2480–2493. doi:10.1109/TIP.2017.2675200
- Larsen DH, Hari F, Clapperton JA, Gwerder M, Gutsche K, Altmeier M, Jungmichel S, Toledo LI, Fink D, Rask M-B, et al. 2014. The NBS1–Treacle complex controls ribosomal RNA transcription in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **16**: 792–803. doi:10.1038/ncb3007
- Lawrimore J, Barry TM, Barry RM, York AC, Friedman B, Cook DM, Akialis K, Tyler J, Vasquez P, Yeh E, et al. 2017. Microtubule dynamics drive enhanced chromatin motion and mobilize telomeres in response to DNA damage. *Mol Biol Cell* **28**: 1701–1711. doi:10.1091/mbc.e16-12-0846
- Lehtimäki JI, Fenix AM, Kotila TM, Balistreri G, Paavolainen L, Varjosalo M, Burnette DT, Lappalainen P. 2017. UNC-45a promotes myosin folding and stress fiber assembly. *J Cell Biol* **216**: 4053–4072. doi:10.1083/jcb.201703107
- Lindström MS, Jurada D, Bursac S, Orsolic I, Bartek J, Volarevic S. 2018. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene* **37**: 2351–2366. doi:10.1038/s41388-017-0121-z
- Liu N, Lee CH, Swigut T, Grow E, Gu B, Bassik MC, Wysocka J. 2018. Selective silencing of euchromatic L1s revealed by genome-wide screens for L1 regulators. *Nature* **553**: 228–232. doi:10.1038/nature25179
- Lottersberger F, Karssemeijer RA, Dimitrova N, de Lange T. 2015. 53BP1 and the LINC complex promote microtubule-dependent DSB mobility and DNA repair. *Cell* **163**: 880–893. doi:10.1016/j.cell.2015.09.057
- Mangeot PE, Risson V, Fusil F, Marnef A, Laurent E, Blin J, Mournetas V, Massourides E, Sohler TJM, Corbin A, et al. 2019. Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived ‘nanoblades’ loaded with Cas9–sgRNA ribonucleoproteins. *Nat Commun* **10**: 45. doi:10.1038/s41467-018-07845-z
- Marnef A, Cohen S, Legube G. 2017. Transcription-coupled DNA double-strand break repair: active genes need special care. *J Mol Biol* **429**: 1277–1288. doi:10.1016/j.jmb.2017.03.024
- Matsumoto A, Sakamoto C, Matsumori H, Katahira J, Yasuda Y, Yoshidome K, Tsujimoto M, Goldberg IG, Matsuura N, Nakao M, et al. 2016. Loss of the integral nuclear envelope protein SUN1 induces alteration of nucleoli. *Nucleus* **7**: 68–83. doi:10.1080/19491034.2016.1149664
- McStay B. 2016. Nucleolar organizer regions: genomic ‘dark matter’ requiring illumination. *Genes Dev* **30**: 1598–1610. doi:10.1101/gad.283838.116
- Meisenberg C, Pinder SI, Hopkins SR, Wooller SK, Benstead-Hume G, Pearl FMG, Jeggo PA, Downs JA. 2019. Repression of transcription at DNA breaks requires cohesin throughout interphase and prevents genome instability. *Mol Cell* **73**: 212–223.e7. doi:10.1016/j.molcel.2018.11.001
- Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. 2016. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin Cancer Biol* **37–38**: 51–64. doi:10.1016/j.semcancer.2016.03.003
- Moujaber O, Omran N, Kodiha M, Pié B, Cooper E, Presley JF, Stochaj U. 2017. Data on the association of the nuclear envelope protein Sun1 with nucleoli. *Data Brief* **13**: 115–123. doi:10.1016/j.dib.2017.05.028
- Mourad R, Ginalski K, Legube G, Cuvier O. 2018. Predicting double-strand DNA breaks using epigenome marks or DNA at kilobase resolution. *Genome Biol* **19**: 34. doi:10.1186/s13059-018-1411-7
- Negash A, Labouesse S, Sandeau N, Allain M, Giovannini H, Idier J, Heintzmann R, Chaumet PC, Belkebir K, Sentenac A. 2016. Improving the axial and lateral resolution of three-dimensional fluorescence microscopy using random speckle illuminations. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* **33**: 1089–1094. doi:10.1364/JOSAA.33.001089
- Németh A, Grummt I. 2018. Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Curr Opin Cell Biol* **52**: 105–111. doi:10.1016/j.ceb.2018.02.013
- Noon AT, Shibata A, Rief N, Löbrich M, Stewart GS, Jeggo PA, Goodarzi AA. 2010. 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* **12**: 177–184. doi:10.1038/ncb2017
- Oshidari R, Strecker J, Chung DKC, Abraham KJ, Chan JNY, Damaren CJ, Mekhail K. 2018. Nuclear microtubule filaments mediate non-linear directional motion of chromatin and promote DNA repair. *Nat Commun* **9**: 2567. doi:10.1038/s41467-018-05009-7
- Oza P, Jaspersen SL, Miele A, Dekker J, Peterson CL. 2009. Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes Dev* **23**: 912–927. doi:10.1101/gad.1782209
- Pal S, Postnikoff SD, Chavez M, Tyler JK. 2018. Impaired cohesion and homologous recombination during replicative aging in budding yeast. *Sci Adv* **4**: eaaq0236. doi:10.1126/sciadv.aaq0236
- Pefani DE, Tognoli ML, Pirincci Ercan D, Gorgoulis V, O’Neill E. 2018. MST2 kinase suppresses rDNA transcription in response to DNA damage by phosphorylating nucleolar histone H2B. *EMBO J* **37**: e98760. doi:10.15252/embj.201798760
- Peng JC, Karpen GH. 2007. H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat Cell Biol* **9**: 25–35. doi:10.1038/ncb1514
- Rea S, Eisenhaber F, O’Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, et al. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593–599. doi:10.1038/35020506
- Richardson CD, Kazane KR, Feng SJ, Zelin E, Bray NL, Schäfer AJ, Floor SN, Corn JE. 2018. CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. *Nat Genet* **50**: 1132–1139. doi:10.1038/s41588-018-0174-0
- Robbez-Masson L, Tie CHC, Conde L, Tunbak H, Husovsky C, Tchasovnikarova IA, Timms RT, Herrero J, Lehner PJ, Rowe HM. 2018. The HUSH complex cooperates with TRIM28 to

Marnet et al.

- repress young retrotransposons and new genes. *Genome Res* **28**: 836–845. doi:10.1101/gr.228171.117
- Ryu T, Spatola B, Delabaere L, Bowlin K, Hopp H, Kunitake R, Karpen GH, Chiolo I. 2015. Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair. *Nat Cell Biol* **17**: 1401–1411. doi:10.1038/ncb3258
- Schrank BR, Aparicio T, Li Y, Chang W, Chait BT, Gundersen GG, Gottesman ME, Gautier J. 2018. Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. *Nature* **559**: 61–66. doi:10.1038/s41586-018-0237-5
- Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ. 2002. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* **16**: 919–932. doi:10.1101/gad.973302
- Shanbhag NM, Rafalska-Metcalf IU, Balane-Bolivar C, Janicki SM, Greenberg RA. 2010. ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* **141**: 970–981. doi:10.1016/j.cell.2010.04.038
- Spichal M, Brion A, Herbert S, Coumac A, Marbouty M, Zimmer C, Koszul R, Fabre E. 2016. Evidence for a dual role of actin in regulating chromosome organization and dynamics in yeast. *J Cell Sci* **129**: 681–692. doi:10.1242/jcs.175745
- Swartz RK, Rodriguez EC, King MC. 2014. A role for nuclear envelope-bridging complexes in homology-directed repair. *Mol Biol Cell* **25**: 2461–2471. doi:10.1091/mbc.e13-10-0569
- Tchasovnikarova IA, Timms RT, Matheson NJ, Wals K, Antrobus R, Göttgens B, Dougan G, Dawson MA, Lehner PJ. 2015. Gene silencing. Epigenetic silencing by the HUSH complex mediates position-effect variegation in human cells. *Science* **348**: 1481–1485. doi:10.1126/science.aaa7227
- Tsouroula K, Furst A, Rogier M, Heyer V, Maglott-Roth A, Ferrand A, Reina-San-Martin B, Soutoglou E. 2016. Temporal and spatial uncoupling of DNA double strand break repair pathways within mammalian heterochromatin. *Mol Cell* **63**: 293–305. doi:10.1016/j.molcel.2016.06.002
- Tubbs A, Nussenzweig A. 2017. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. *Cell* **168**: 644–656. doi:10.1016/j.cell.2017.01.002
- Ui A, Nagaura Y, Yasui A. 2015. Transcriptional elongation factor ENL phosphorylated by ATM recruits polycomb and switches off transcription for DSB repair. *Mol Cell* **58**: 468–482. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.023
- van Sluis M, McStay B. 2015. A localized nucleolar DNA damage response facilitates recruitment of the homology-directed repair machinery independent of cell cycle stage. *Genes Dev* **29**: 1151–1163. doi:10.1101/gad.260703.115
- Warmerdam DO, van den Berg J, Medema RH. 2016. Breaks in the 45S rDNA lead to recombination-mediated loss of repeats. *Cell Rep* **14**: 2519–2527. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.048

Résumés

La réparation des cassures double-brin de l'ADN (DSB) est essentielle pour préserver l'intégrité du génome. Suite à l'apparition de DSB dans le génome, la PI3K kinase ATM permet la phosphorylation du variant d'histone H2AX sur un large domaine chromatinien de l'ordre du mégabase, qui constituera ainsi un foyer de réparation. La façon dont ces foyers sont assemblés aussi rapidement pour établir un environnement nucléaire favorable à la réparation n'est pas encore connue. Les TAD (Topologically Associated Domains) correspondent à des régions chromatinienne organisées en 3D dans le noyau et sont déjà connus comme étant impliqués dans des processus cellulaires tels que la transcription ou la réplication. Cependant leur rôle dans la réparation de l'ADN n'est pas encore connu à ce jour.

Nous avons ainsi pu montrer que les TAD sont des unités fonctionnelles de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN puisqu'ils servent de matrice à la formation des foyers de réparation. En effet, nous avons montré que la phosphorylation de H2AX sur un TAD entier est permise grâce à un processus d'extrusion de boucle de chromatine dépendant des cohésines et ayant lieu de part et d'autre de chaque DSB. Ces travaux ont permis de montrer le rôle majeur de la conformation des chromosomes dans la maintenance de l'intégrité du génome tout en mettant en évidence pour la première fois un exemple de modification de la chromatine grâce au processus d'extrusion de boucle de chromatine.

D'autre part, nous avons montré que les TAD du génome entier sont renforcés en réponse aux DSB et jouent un rôle majeur dans la répression transcriptionnelle qui a lieu en cis des DSB.

Enfin, nous avons démontré que des TAD entiers contenant une DSB sont capables de se déplacer au sein du noyau pour se regrouper entre eux en G1. De façon importante, nous avons montré que ce regroupement des TAD endommagés peut conduire à la formation de translocations, événement pouvant mener à l'apparition de cancers.

DNA Double-Strand Breaks (DSBs) repair is essential to safeguard genome integrity. Upon DSBs, the ATM PI3K kinase rapidly triggers the establishment of a megabase-sized, γ H2AX-decorated chromatin domains which further act as seeds for the formation of DNA Damage Response (DDR) foci. How these foci are rapidly assembled in order to establish a "repair-prone" environment within the nucleus is yet unclear. Topologically Associating Domains (TADs) are a key feature of 3D genome organization that regulate transcription and replication, but little is known about their contribution to DNA repair processes.

We found that TADs are functional units of the DDR, instrumental for the correct establishment of γ H2AX/53BP1 chromatin domains in a manner that involves cohesin-mediated loop extrusion on both sides of the DSB. Indeed, we showed that H2AX-containing nucleosomes are rapidly phosphorylated as they actively pass by DSB-anchored cohesin. This work highlights the critical impact of chromosome conformation in the maintenance of genome integrity and provides the first example of a chromatin modification established by loop extrusion.

In another hand, we found that TADs of the whole genome are reinforced following DSB induction and that TADs play a major role in the down-regulation of the transcription which takes place in cis of DSBs.

Finally, we found that damaged-TADs can move across the nucleus to cluster together in the G1 phase of the cell cycle. We also found that damaged-TADs clustering can lead to the formation of translocations, which are often at the origin of cancers.