



HAL
open science

Mise en évidence d'une interaction entre la protéine 53BP1 et les fragments d'Okazaki

Mélissa Leriche

► **To cite this version:**

Mélissa Leriche. Mise en évidence d'une interaction entre la protéine 53BP1 et les fragments d'Okazaki. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS065 . tel-03685186

HAL Id: tel-03685186

<https://theses.hal.science/tel-03685186>

Submitted on 2 Jun 2022

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.

Mise en évidence d'une interaction entre la protéine 53BP1 et les fragments d'Okazaki

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 582, cancérologie: biologie - médecine - santé
(CBMS)

Spécialité de doctorat: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Unité de recherche: Université Paris-Saclay, CNRS, UMR3348, Intégrité du génome,
ARN et cancer, 91401, Orsay Cedex, France.
Réfèrent: Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 19 Mai 2020, par

Mélissa LERICHE

Composition du Jury

Simon SAULE Professeur, Institut Curie, Orsay	Président
Béatrice EYMIN DR1, IAB, Grenoble	Rapporteur
Stéfania MILLEVOI CR1, CRCT, Toulouse	Rapporteur
Olivier SORDET CR1, CRCT, Toulouse	Examineur
Stéphan VAGNER DR1, Institut Curie, Orsay	Directeur de thèse
Patricia UGUEN MCU, Université Paris Saclay	Invitée



université
PARIS-SACLAY



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier La Ligue nationale contre le cancer qui a financé intégralement mes quatre années de doctorat.

Je tiens également à remercier sincèrement l'ensemble des membres du jury, les docteurs Stéfania Millevoi, Béatrice Eymin, Patricia Uguen, Olivier Sordet et Simon Saule d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je tiens bien sûr à remercier tout particulièrement le docteur Stéphan Vagner, mon directeur de thèse. Je dois d'abord te remercier d'avoir accepté que j'intègre l'équipe Mélanome à Gustave Roussy en 2015. J'y ai énormément appris. Puis, alors que mon contrat se terminait, tu m'as proposé d'intégrer l'institut Curie pour y effectuer une thèse. Je me souviens encore de ton mail. Pour ça, je te remercie pour ta confiance. Merci également pour ton encadrement et ta rigueur, parfois déstabilisante pour moi mais très formatrice.

Merci au docteur Patricia Uguen. Tu es arrivée au bon moment. Je pense que je n'aurais pas pu en arriver là sans toi. Au-delà de ton expertise scientifique et ta très grande ouverture d'esprit, tu as su me mettre en confiance et me faire évoluer. Merci pour ces nombreuses conversations scientifiques et non scientifiques d'ailleurs, très enrichissantes. Merci de m'avoir prise sous ton aile. Inutile de préciser que je te remercie énormément de m'avoir « dépanné » lorsque j'ai bêtement oublié mes clés dans mon appart deux jours avant de rendre mon manuscrit. Quelle aventure !

Merci à la directrice de l'UMR3348, le docteur Mounira Amor-Gueret, de m'avoir accueillie gentiment au sein de son unité. Je ne t'en veux absolument pas de m'avoir appelée Sabrina pendant presque quatre ans.

Merci au docteur Sarah Lambert pour l'expertise et les connaissances scientifiques que tu as pu apporter tout le long de ma thèse.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'UMR3348, toutes équipes confondues, pour m'avoir aidée, soutenue et conseillée pendant ces quatre années.

Mais quelques remerciements particuliers valent la peine d'être écrits :

Merci au duo de compét' Pascale et Laurence. Merci de m'avoir souvent ouvert les portes de ton cabinet des plaintes Pascale, et bien sûr merci pour ton écoute et ton humour. Laurence, je me souviens quand je suis arrivée, c'est toi qui m'a accueillie en bas, nous étions nouvelles toutes les deux. Merci également pour ton écoute et d'être ma marraine Costco !

Je remercie les membres actifs de la cafet' du midi, particulièrement Isaac pour ton humour et ta pointe masculine et Romane pour tes nombreuses anecdotes rigolotes et efficaces.

Je tiens également à remercier ma grande sœur de cœur Gégé et membre unique de l'unité. Je n'aurai pas assez de ces lignes pour te faire part de ma grande reconnaissance. Je pourrais employer beaucoup de qualificatifs, mais quelques-uns suffiront : unique, généreuse, gentille, sincère et sensible. Merci de m'avoir supportée et portée parfois lorsque je n'étais pas au plus haut de ma forme. Merci pour tout, pour tes conseils professionnels mais aussi et surtout personnels. Tu fais partie de mes piliers dans la vie. Ne change pas et n'oublie pas un truc « tu t'en fous de l'avis (la vie aussi) des autres ! ».

Un très grand merci à ma collègue chérie Sabrina. Merci de m'avoir prêtée ton cerveau quand j'en ai eu besoin. Merci de m'avoir accompagnée et aidée dans les manips, sans toi ça aurait été bien plus compliqué. Merci pour ta simplicité et ta gentillesse. Continue de « réfléchir » comme tu le fais souvent. Ça a été un grand honneur de partager ma vie de thésarde avec toi et également de partager

ton cerveau car à nous deux, on fait au moins un cerveau, c'est sûr, surtout pour les calculs de dilutions et de concentrations. Et enfin merci pour toutes ces conversations dans le labo et au bureau qui n'avaient rien, mais alors rien avoir avec le boulot mais qui font tellement de bien.

Merci Gaëlle, ça ne fait pas longtemps que l'on se connaît et pourtant j'ai l'impression que l'on se connaît depuis au moins 4 ans tellement on a déjà parlé. Je te remercie pour ta bonne humeur, ton humour mais également pour ton soutien. (PS : tu es une maman qui déchire !).

Un grand merci également aux deux thésardes qui sont passées avant moi et qui m'ont également aidée à avancer et à avoir confiance en moi, Rym et Iris. Merci de m'avoir conseillée tant professionnellement que personnellement. Iris, tu es un modèle pour moi, tes parcours personnel et professionnel me touchent beaucoup. Rym, ta présence et ton rire me manquent ainsi que nos sorties en courses. Tu m'as beaucoup aidée et encadrée au début de ma thèse et pour ça je te remercie énormément.

Je tiens à remercier également le reste des membres de l'équipe Vagner. Merci Martin pour ton originalité. Merci Sylvain pour ta disponibilité, ta générosité et ton sens de l'écoute. J'espère rester ta râleuse préférée. Merci de m'avoir aidée tout au long de ma thèse. Merci Alina, pour ta gentillesse, tes conseils, et de m'avoir aidée à progresser en anglais, même si c'est sûr je ne suis toujours pas bilingue mais c'est mieux qu'avant. Tu es une personne très courageuse et je t'admire beaucoup. Merci à Titash pour tes conseils scientifiques très avisés. Merci aux deux nouvelles ingé, Amélie et Dorothée et à Clara de m'avoir aidée à continuer les manip. Merci surtout à toi Dorothée d'avoir été pendant un an ma binôme de sport, on a fait ce qu'on a pu, c'est le principal !

J'adresse également un merci tout particulier au club des 6, anciennement le Mel'club. Merci Charlotte, Sarah, Vincent, Julien et Matthieu. Vous êtes entrés dans ma vie à un moment où les choses étaient un peu compliquées pour moi, vous avez su me changer les idées et de belles amitiés sont nées. J'espère de tout cœur continuer nos super sorties. Merci Julien pour les nombreuses conversations que l'on a pu avoir au labo. Merci mon grand Vincent, notre doyen, pour ton aide au labo et pour l'écriture de mon intro. Merci Matthieu, mais tu sais pourquoi, d'ailleurs je reviendrai sur ton cas un peu plus loin.

Je ne serais bien sûr pas là sans être passée par la case Gustave Roussy. Je remercie donc tous mes anciens collègues de Gustave Roussy, Caroline, Isabelle, Virginie, Delphine, Ramdane, Sandrine, Michael, Shensi, Jonathan et Hélène d'avoir partagé avec moi mon premier « vrai » boulot. Je remercie tout particulièrement Caro d'avoir cru en moi jusqu'au bout et Isa de m'avoir fait confiance et appris tellement de choses. Merci merci merci.

Je remercie mes trois amies de toujours qui n'ont jamais cessé de m'encourager tout au long de ces 4 années, Mélissa, Claire et Jeanne. Vous m'avez toujours soutenue, relevé quand j'en ai eu besoin et surtout vous avez eu confiance en moi, j'espère continuer à partager encore beaucoup de bons moments avec vous. Merci pour tout mes poules !

Enfin, tout ceci n'aurait pas été permis sans ma famille, ma petite famille Maman, Papa, Pauline et Guillaume. A votre manière et malgré la distance (oui 200 km c'est beaucoup pour nous les ch'ti), vous m'avez toujours soutenue et m'avez poussée à croire en moi, ce n'est pas encore parfait mais il y a de l'amélioration. Vous rendre fiers de moi est une de mes priorités et j'espère y être un peu arrivée. Il y a bien sur un dernier membre de ma famille que j'aimerai remercier de tout mon cœur : Matthieu. Tu as su me supporter jusque-là et surtout me porter. Tu as toujours été là pour m'aider dans n'importe quelle situation. Pour tout ça, je ne peux que te remercier du fond du cœur. Sache que passer ma vie à tes côtés me fait le plus grand bien et ne t'en fais pas, je resterai toujours ta tornade imprévisible.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	4
LISTE DES ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	11
INTRODUCTION	12
<u>1. Les protéines de liaison aux ARN (RBP)</u>	14
1.1. <i>Les méthodes d'identification des RBP à petite et grande échelle</i>	15
1.2. <i>Les domaines classiques de liaison aux ARN</i>	19
1.2.1. Le « RNA recognition motif » ou domaine RRM.....	19
1.2.2. Le « hnRNP K homology domain » ou domaine KH.....	19
1.2.3. Le « zinc finger domain » ou domaine ZnF.....	20
1.2.4. Le « double-strand RNA binding domain » ou domaine dsRBD.....	20
1.3. <i>Les domaines associés aux RBP intrinsèquement désordonnées</i>	21
1.3.1. Les répétitions RG/RGG.....	22
1.3.2. Les motifs riches en RS.....	23
1.3.3. Les « short linear motifs » ou SLiM.....	23
1.3.4. Les longs segments K/R.....	23
<u>2. La réponse aux dommages de l'ADN</u>	24
2.1. <i>Nature et origine des dommages de l'ADN</i>	25
2.1.1. Les sources exogènes des lésions de l'ADN.....	25
2.1.2. Les sources endogènes des lésions de l'ADN.....	27
2.1.2.1. <i>La réplication de l'ADN</i>	28
2.1.2.2. <i>Les erreurs de réplication et leur prise en charge</i>	34
2.1.3. Le stress de réplicatif : les causes, sa signalisation et les conséquences...36	

2.1.3.1. Les causes du stress réplicatif.....	36
2.1.3.2. La signalisation du stress réplicatif.....	37
2.1.3.3. Les conséquences du stress réplicatif sur la fourche de réplication.....	38
2.2. La réparation des dommages de l'ADN.....	39
2.2.1. La réparation des cassures simple-brin de l'ADN.....	40
2.2.1.1. La réparation par excision de bases (BER).....	40
2.2.1.2. La réparation par excision de nucléotides (NER).....	40
2.2.1.3. La réparation des mésappariements (MMR).....	41
2.2.2. La réparation des cassures double-brin de l'ADN.....	41
2.2.2.1. La réparation des cassures double-brin via la NHEJ.....	42
2.2.2.2. La réparation des cassures double-brin via la HR.....	45
2.3. La signalisation des cassures double-brin de l'ADN et le choix des voies de réparation.....	48
2.3.1. La signalisation des cassures double-brin de l'ADN.....	48
2.3.2. Le choix des voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN.....	50
2.4. La recombinaison homologue au secours des fourches de réplication.....	52
2.4.1. La protection des fourches de réplication bloquées.....	52
2.4.2. La réversion de fourches de réplication.....	53
2.4.3. Le redémarrage des fourches de réplication.....	53
3. Les protéines de liaison aux ARN et la réponse aux dommages de l'ADN.....	54
3.1. Le rôle des protéines de liaison aux ARN dans le contrôle de l'expression des gènes de réponse aux dommages de l'ADN.....	55
3.2. Le rôle des protéines de liaison aux ARN dans la prévention et la réparation des dommages de l'ADN.....	57
3.2.1. La prévention des dommages de l'ADN.....	57
3.2.2. La réparation des dommages de l'ADN.....	58
3.3. La régulation des RBP par les protéines du DDR.....	60

3.4. Le contrôle de la réparation de l'ADN par l'ARN.....	61
3.4.1. Les (pré)-ARN messagers : cibles des protéines classiques du DDR.....	61
3.4.2. Les ARN non-codants courts et longs : des acteurs à part entière du DDR.....	62
3.4.2.1. Les ARN non-codants courts (micro-ARN).....	62
3.4.2.2. Les ARN non-codants longs (lncRNA).....	64
3.4.2.3. Les ARN produits aux sites de dommages.....	66
PRESENTATION ET OBJECTIF DE L'ETUDE	70
<u>1.Contexte de l'étude</u>.....	71
1.1. 53BP1 possède un domaine putatif de liaison à l'ARN.....	71
1.2. Le recrutement de 53BP1 aux sites de dommages nécessite la présence d'une composante de type ARN.....	71
1.3. 53BP1 est par ailleurs une protéines clé du DDR.....	72
1.4. 53BP1 est aussi présent à la fourche de réplication.....	73
<u>2.Objectif de l'étude</u>.....	74
RESULTATS	75
<u>1.Choix des approches expérimentales et principaux résultats obtenus</u>.....	75
<u>2.Article "53BP1 is an RNA-binding protein that interacts with Okazaki fragments"</u>.....	78
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	107
1. <u>Vers un nouveau rôle de 53BP1 dans la réplication de l'ADN</u>	108
2. <u>53BP1 est une protéine de liaison à l'ARN</u>	110
REFERENCES.....	113
ANNEXES.....	134

LISTE DES ABREVIATIONS

4-SU	4-thiouridine
6-4 PP	6–4 pyrimidine–pyrimidone/6–4 pyrimidine–pyrimidinone
6-SG	6-thioguanosine
8-oxoG	8-Oxoguanine
53BP1	p53-binding protein 1
ABRAXAS	BRCA1-A complex subunit Abraxas 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPC	Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform
APE1	Apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease 1
ARE	AU-riche element
ARE-BP	AU-rich element binding protein
ARN	Acide ribonucléique
Art-SCID	Artemis-deficient Severe combined immunodeficiency
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM- and rad3- related
ATRIP	ATR-interacting protein
AUF1	AU-binding factor 1
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain 1
BER	Base-excision repair
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BIR	Break-induced replication
BLM	Bloom syndrome protein
BRCA1	Breast cancer 1
BRCC36	BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3
BRCT	BRCA1-C terminus
cCL	Conventional crosslink
Cdc45	Cell division cycle 45
Cdc48	Cell division control protein 48
CDC5L	Cell division cycle 5-like protein
Cdc6	Cell division cycle 6
CDK	Cyclin-dependent kinase
Chk1	Checkpoint kinase 1
Cdt1	DNA replication factor 1
CLIP	Crosslinking and immunoprecipitation
CLR2^{Lrr1}	CUL-2 RING E3 ubiquitin-ligase and the Leucine Rich Repeat 1
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimer
CSA	Cockayne syndrome A protein
CSB	Cockayne syndrome B protein
CTD	Carboxy terminal domain
CtIP	CtBP-interacting protein
DDK	DBF4-dependent kinase
DDR	DNA damage response
DDRBP	DNA damage response RBP
DDRNA	DNA damage response RNA
DDSR1	DNA damage-sensitive RNA1
DDX3	DEAD-Box Helicase 3

DDX5	DEAD-Box Helicase 5
dilncRNA	Damage-induce long non-coding RNA
DNA2	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2
DNA	Dexoxyribonucleic acid
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytique subunit
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DSB	Double-strand break
dsRBM	Double-strand RNAbinding motif
ETAA1	Ewing's tumor-associated antigen 1
Exo1	Exonuclease 1
FA	Fanconi anemia
FEN1	Flap endonuclease 1
FMRP	Fragile X mental retardation protein
GAR	Glycine/arginine rich
GGR	Global genomic-NER
H2AX	Histone 2A (H2A) variant H2AX
H₂O₂	Hydrogen peroxide
HDAC2	Histone deacetylase 2
hnRNP	Heterogeneous nuclear protein
HOTAIR	HOX Transcript Antisense Intergenic RNA
HR	Homologous recombination
HTLF	Human T-cell leukemia virus enhancer factor
hTR	Human telomerase. RNA
IDP	Intrinsically disordered protein
IDR	Intrinsically disordered region
IR	Ionizing radiation
Kd	Constante de dissociation
KH	K-homology
KRSP	K-homology splicing regulatory protein
LIG4	DNA ligase 4
LINP1	lncRNA in NHEJ pathway1
lncRNA	long non-coding RNA
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCM	Minichromosome maintenance
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein1
MDM2	Murin double minute 2
MK2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
MMC	Mitomycin C
MMR	Mismatch repair
MMS	Methyl methanesulfonate
MRN	MRE11-Rad50-NBS1
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NER	Nucleotide-excision repair
NF-YA	Nuclear transcription factor Y subunit alpha
NHEJ	Non-homologous end-joining
NonO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein
MRE11	Meiotic recombination 11
Nt(s)	Nucléotide(s)
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PANDA	p21-associated lncRNA DNA damage activated
PAR-CL	Photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslink
PARP1	Poly(ADP-ribose) polymérase 1

PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PLRG1	Pleiotropic regulator 1
PNKP	Polynucleotide phosphatase kinase
Pre-IC	Pre-initiation complex
Pre-RC	Pre-replication complex
PRMT	Protein arginine methyltransferase
PTIP	PAX transcription activation domain interacting protein
OOPS	Orthogonal organic phase separation
ORC	Origin recognition complex
ORI	origin of replication
RAP80	Receptor-associated protein 80
RBD	RNA-binding domain
RBM	RNA-binding motif
RBMX	RNA binding motif protein X-linked
RBP	RNA-binding protein
RecQL4	RecQ Like Helicase 4
RFC	Replication factor C
RIF1	Replication Timing Regulatory Factor 1
RNA	Ribonucleic acid
RNA-IC	RNA interactome capture
RNase	Ribonuclease
RNF168	Ring finger protein 168
RNF8	Ring finger protein 8
RPA	Replication protein A
RRM	RNA recognition motif
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis
SerIC	Serial interactome capture
SETD2	Histone-lysine N-methyltransferase
SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamine-rich
SIRT1	Sirtuin 1
SLiM	Short linear motif
SMARCAL1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1
SRPK1	Sérine / thréonine-protéine kinase 1
SRPK2	Sérine / thréonine-protéine kinase 2
SRSF1	Serine and arginine rich splicing factor 1
SRSF2	Serine and arginine rich splicing factor 2
SSB	Single-strand break
SSR	Single strand streak
TAF15	TATA-binding protein-associated factor 2N
TCR	Transcription-coupled-NER
TERRA	Telomeric repeat-containing RNA
TIAL1	TIA1 Cytotoxic Granule Associated RNA Binding Protein Like 1
TLS	Translesion synthesis
TODRA	Transcribed in the Opposite Direction of RAD51
TOP-I	Topoisomerase 1
TopBP1	Topoisomerase-binding protein 1
TRAPP	Total RNA-associated protein purification
TREX	Transcription/export
TS	Template switching
TTP	Tristetraprolin

UBC13	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
UDR	Ubiquitin-dependent recruitment
UPF1	Regulator of nonsense transcripts 1
UTR	Untranslated Transcribed Region
UV	Ultraviolet
XLF	XRCC4-like factor
XPA	Xeroderma pigmentosum type A
XPB/ERCC3	Xeroderma pigmentosum type B
XPD/ERCC2	Xeroderma pigmentosum type D
XPF/ERCC4	Xeroderma pigmentosum type F
XRCC1	X-ray repair Cross complementing 1
XRCC4	X-ray repair cross-complementing 4
XRN2	5'-3' Endonuclease 2
ZnF	Zinc finger
YRA1	RNA annealing protein
ZRANB3	Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 3

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les méthodes de « *RNA interactome capture* » (RNA-IC).

Figure 2 : La méthode du « *serial interactome capture* » (serIC) comparée à celle du « *RNA interactome capture* » (RNA-IC).

Figure 3 : La méthode de OOPS (« *orthogonal organic phase separation* »).

Figure 4 : La méthode de CLIP (« *crosslinking and immunoprecipitation* »).

Figure 5 : Pourcentage de protéines identifiées en RNA-IC ne possédant pas de RBD connus.

Figure 6 : La réponse aux dommages de l'ADN (« *DNA damage response* » ou DDR).

Figure 7 : Les différentes étapes de l'initiation de la réplication.

Figure 8 : Les différentes étapes de l'élongation de la réplication.

Figure 9 : Les voies du « *short flap* » et du « *long flap* ».

Figure 10 : Les différentes étapes de terminaison de la réplication de l'ADN.

Figure 11 : Représentation schématique des deux principaux modes de tolérance aux dommages.

Figure 12 : Les différentes sources du stress réplicatif.

Figure 13 : Les principaux acteurs de la signalisation du stress réplicatif et ses conséquences sur la réplication de l'ADN.

Figure 14 : Les principaux types de lésions à l'ADN, les types de dommages qu'ils engendrent et leur voie de réparation.

Figure 15 : Schéma représentatif des principales voies de réparation des cassures simple-brin de l'ADN.

Figure 16 : Les principales étapes de la NHEJ et les partenaires protéiques impliqués.

Figure 17 : Les principales étapes de la HR et les partenaires protéiques impliqués.

Figure 18 : La voie de transduction du signal ATM associée à la chromatine.

Figure 19 : Les multiples protéines de liaison aux ARNm de p53 et leur implication dans le contrôle de l'expression de p53 en réponse à différents types de dommages.

Figure 20 : Principaux miRNA affectant les composants du DDR.

Figure 21 : La formation des foyers de réparation des dommages aidée par la transcription.

Figure 22 : 53BP1, une protéine intrinsèquement désordonnée.

Figure 23 : Les différents domaines protéiques de 53BP1.

INTRODUCTION

L'intégrité du génome est constamment menacée par des événements d'origine endogène (i.e. propre au métabolisme de la cellule) ou exogène (i.e. relatif à l'environnement extérieur de la cellule). La réparation des dommages qu'ils infligent à l'ADN est parfaitement exécutée grâce à des mécanismes très élaborés développés par les cellules. Ces mécanismes sont regroupés sous le terme de réponse aux dommages de l'ADN. Ce sont des voies de réponse coordonnées pour détecter et réparer les dommages de l'ADN, réguler le cycle cellulaire et la transcription mais également déterminer le sort des cellules. De ce fait, de très nombreuses protéines, aux rôles et propriétés très différents, sont impliquées dans ces différents niveaux de régulations de réparations des dommages de l'ADN et de surcroît, dans le maintien de l'intégrité du génome. Ces dernières années, les protéines de liaison aux ARN ainsi que les ARN eux-mêmes émergent comme facteurs à part entière du maintien de l'intégrité du génome.

Dans cette introduction, nous présenterons, tout d'abord les caractéristiques et les rôles des protéines de liaison aux ARN. Ensuite, nous décrirons les sources de dommages de l'ADN, les différentes voies de réparation des dommages de l'ADN ainsi que leur signalisation. Enfin, à travers divers exemples, nous montrerons l'importance de l'implication des protéines de liaison aux ARN ainsi que des ARN eux-mêmes dans la réponse aux dommages de l'ADN.

1. Les protéines de liaison aux ARN (RBP)

Dans la cellule, l'ARN est très rarement seul. En effet, dès qu'il est transcrit, il est rapidement pris en charge par des complexes ribonucléoprotéiques constitués d'ARN et de protéines de liaison à l'ARN (« *RNA-binding protein* » ou RBP). Ces protéines sont impliquées dans toutes les étapes du métabolisme de l'ARN, à savoir la synthèse, la maturation, le transport, le stockage, la stabilité et la traduction, afin de réguler l'expression (transcriptionnelle et post-transcriptionnelle) des gènes.

Les RBP sont généralement considérées comme des protéines qui lient l'ARN *via* un ou plusieurs de leurs domaines globulaires de liaison à l'ARN (« *RNA-binding domain* » ou RBD), détaillés plus loin, et modifient le devenir et/ou la fonction des ARN liés. Les efforts récents pour identifier de nouvelles RBP grâce aux nouvelles techniques de criblages révèlent qu'il y aurait entre 1500 à 1900 RBP présentes au sein des cellules humaines (Hentze et al., 2018). De plus, il s'avère que certaines protéines impliquées dans des processus biologiques autres que les régulations (post-)transcriptionnelles des gènes soient également des RBP (appelées RBP non conventionnelles), dont beaucoup d'entre-elles présentent des activités enzymatiques (Beckmann et al., 2016). Enfin, la plupart de ces protéines ne contiennent pas de RBD « classiques » et de ce fait posent la question de savoir comment elles interagissent avec l'ARN.

Avant le développement exponentiel des techniques d'identification de nouvelles RBP, ces dernières étaient regroupées en familles. Ces grandes familles de RBP régulant l'expression post-transcriptionnelles des gènes sont :

- les hnRNP (« *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* »), dont au moins 20 membres composent cette famille, désignées de A1 à U. Ces protéines lient les transcrits naissants et contribuent à de multiples aspects du métabolisme des acides nucléiques, y compris l'épissage alternatif, la stabilisation des ARN messagers (ARNm) et la régulation de la transcription et de la traduction (Geuens et al., 2016; Han et al., 2010).
- les protéines SR (« *Serine-Arginine* »). Ce sont essentiellement des régulateurs de l'épissage alternatif et constitutif ; et ont un rôle important dans l'assemblage du spliceosome sur les pré-ARNm. Comme les hnRNP, elles sont impliquées dans la régulation de multiples aspects du programme de l'expression des gènes (Graveley, 2000; Jeong, 2017).
- les protéines ARE-BP (« *AU-rich element binding protein* »). Ces protéines vont lier l'ARN au niveau d'éléments de séquences spécifiques riches en adénine et uridine nommés ARE. La plupart sont responsables de la régulation de la stabilité des ARNm, pour accélérer (TTP, KSRP, AUF1) ou au contraire atténuer (HuR) la dégradation des ARNm. Leur fixation aux ARE peut également moduler l'efficacité traductionnelle et la localisation des ARNm auxquels elles se fixent (Bakheet et al., 2018).

- les protéines RBM (« *RNA-binding motif* »). Elles lient les transcrits primaires et sont principalement des régulateurs de l'épissage mais aussi de la stabilité des ARNm. Les fonctions de beaucoup de ces protéines ne sont pas encore bien définies (Sutherland et al., 2005).

Ces protéines présentent des propriétés communes telles que leur association avec les transcrits primaires, leur localisation subcellulaire et leurs rôles multiples dans le métabolisme des ARNm. Cependant ces propriétés communes sont partagées par d'autres RBP, ainsi leur classification en famille semble troublée et apparaît n'être plus qu'historique.

1.1. Les méthodes d'identification des RBP à petite et grande échelle

Au fil des décennies, la liste des RBP non conventionnelles s'est allongée progressivement, incitant à développer des méthodes plus poussées pour identifier ces RBP de manière plus exhaustive dans les cellules vivantes. C'est la méthode de « *RNA interactome capture* » (RNA-IC) qui a pu le permettre. Ce sont les équipes d'Alexander G. Baltz et d'Alfredo Castello en 2012 qui introduisaient cette méthode, ce qui a permis pour la première fois d'identifier des interactions protéine-ARN *in vivo* à l'échelle de la cellule (Baltz et al., 2012; Castello et al., 2012). Pour l'équipe d'A. Castello, il s'agissait d'utiliser et de comparer deux types de couplage covalents (« *crosslink* » ou CL) aux UV, à savoir les crosslink conventionnels (cCL) et les crosslink améliorés par photoactivation de ribonucléosides (« *photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslink* » ou PAR-CL) puis de les associer à l'identification des protéines purifiées par spectrométrie de masse dans les cellules HeLa (Figure 1A) (Castello et al., 2012). Les cCL permettent de « figer » de manière covalente les interactions protéine-ARN dans des cellules en culture grâce à l'application d'une lumière ultraviolette (irradiation UV-C à 254 nm). Les UV-C traversent les cellules et provoquent la formation de liaisons covalentes entre les ribonucléotides de l'ARN et les acides aminés des protéines distants de quelques angströms. Pour les PAR-CL, c'est le 4-thiouridine (4SU), un analogue de l'uridine, qui, une fois mis en contact avec les cellules en culture, intégré et incorporé dans les ARN naissants, va permettre un couplage très efficace après irradiation UV-A à 365 nm, entre les protéines et les ARN contenant le 4SU. Après irradiation aux UV (à 254 ou 365 nm selon la technique), une purification en condition dénaturante de l'ARN polyadénylé (poly(A)) est effectuée sur des colonnes oligo(dT). Cette étape est suivie de l'identification des protéines purifiées par spectrométrie de masse quantitative. L'équipe de Baltz a également utilisé les PAR-CL pour l'identification du protéome lié à l'ARNm et son profil d'occupation sur l'ARN mais dans les cellules HEK (Figure 1B) (Baltz et al., 2012). Ici le 6-thioguanosine (6-SG) a, en plus du 4-SU, été incorporé dans les cellules au préalable, dans le but d'améliorer l'efficacité du couplage aux UV.

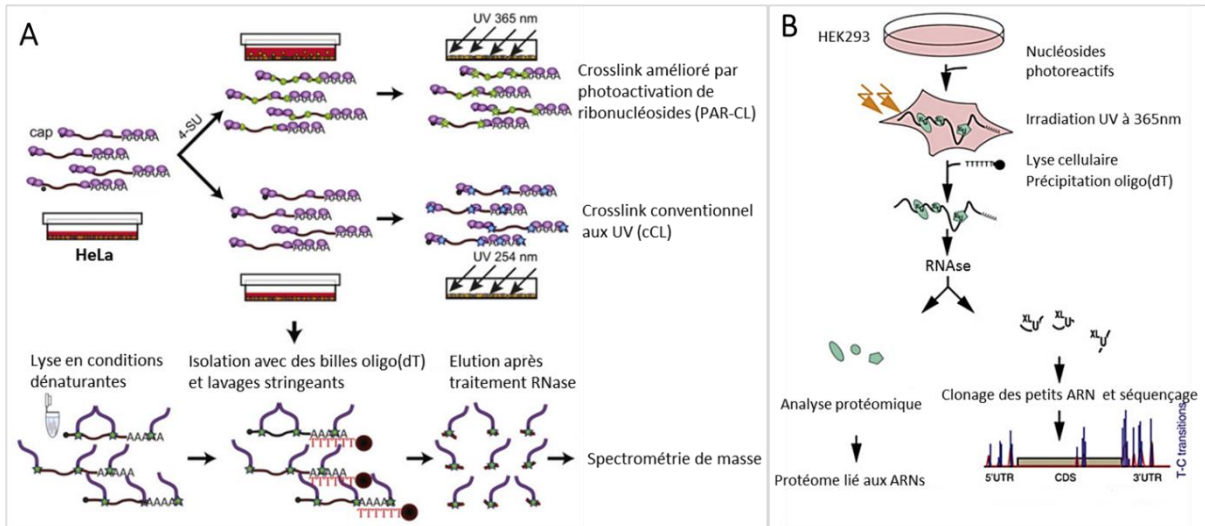


Figure 1 : Les méthodes de « RNA interactome capture » (RNA-IC). (A) RNA-IC développé par Castello et al. réadapté de Castello et al., 2012, (B) RNA-IC développé par Baltz et al. Réadapté de Baltz et al., 2012.

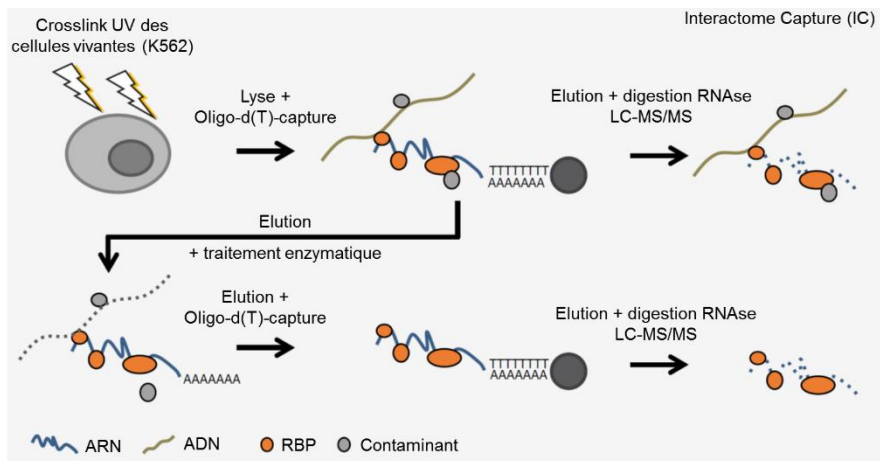


Figure 2 : La méthode du « serial interactome capture » (serIC) comparée à celle du « RNA interactome capture » (RNA-IC). Réadapté de Castello et al., 2016.

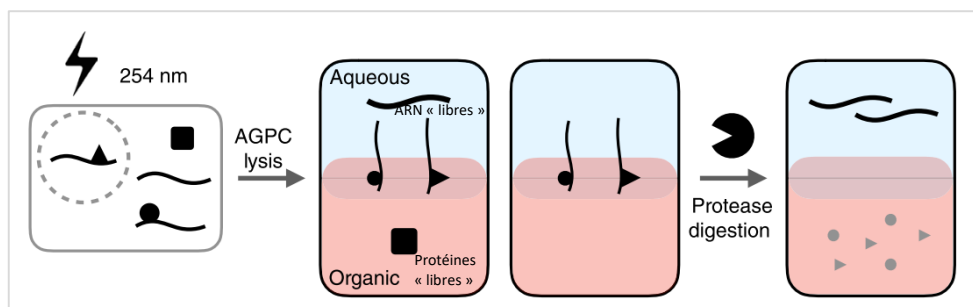


Figure 3 : La méthode de OOPS (« orthogonal organic phase separation »). Réadapté de Queiroz et al., 2019.

Ces études ont ensuite été étendues, selon des protocoles similaires, aux cellules souches embryonnaires de souris en 2013 puis aux levures en 2015 (Beckmann et al., 2015; Kwon et al., 2013). Cependant, l'une des limites aux méthodes précédentes est le manque de résolution spatiale subcellulaire, particulièrement importante si le contexte biologique des interactions protéine-ARN est inconnu. Ainsi en 2016, Thomas Conrad et ses collaborateurs ont été les premiers à appliquer le RNA-IC dans un compartiment précis de cellules humaines (K562) à savoir le noyau. Ils ont ainsi développé le « *serial interactome capture* » (serIC), une méthode qui inclut une série de purifications strictes et répétées des RBP (Figure 2) (Conrad et al., 2016). Le serIC peut facilement être couplé à des traitements enzymatiques intermittents ou à des étapes de sélections et de modifications supplémentaires pour obtenir des complexes protéine-ARN hautement sélectionnés. En bref, cette technique permet de capturer et cataloguer toutes les interactions protéine-ARN possibles dans le noyau (Conrad et al., 2016). Il reste cependant une limite aux méthodes de RNA-IC et serIC : le fait qu'elles ne révèlent que les ARN poly(A) associés aux protéines alors que la plupart des transcrits cellulaires ne sont pas polyadénylés. C'est ainsi que début 2019, une équipe a développé une technique nommée TRAPP, et son variant PAR-TRAPP dont le principe de base reste le même que les précédentes méthodes sauf qu'elles utilisent des billes de silice et non des colonnes oligo(dT) pour la capture des ARN. Pour l'instant, elles n'ont été appliquées que dans le contexte d'identification de nouvelles RBP chez la levure et chez la bactérie *E. coli* (Shchepachev et al., 2019) et ne devraient pas tarder à être appliquées dans les cellules humaines. Enfin, une dernière méthode déjà validée dans les lignées cellulaires humaines HEK293, U2OS et MCF10A est l'« *orthogonal organic phase separation* » (OOPS) (Figure 3) (Queiroz et al., 2019). C'est une méthode simple de séparation de phase basée sur l'acide guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) qui génère deux phases distinctes : la phase supérieure aqueuse, qui contient les ARN et la phase inférieure organique qui contient les protéines. Les complexes ARN-protéines produits après crosslink aux UV à 254 nm, qui combinent les propriétés physico-chimiques des deux molécules, migrent entre les deux phases. L'isolement de cette interphase permet de récupérer toutes les protéines liées aux ARN, de n'importe quels types qu'ils soient. Eventuellement, une digestion protéique puis une deuxième purification AGPC permet d'isoler les ARN qui étaient liés aux protéines. Cette nouvelle méthode présente donc l'avantage d'isoler toutes les protéines liées aux ARN (RNA interactome) de toute la cellule mais également nécessite moins de matériel de départ comparé aux autres techniques citées précédemment.

Toutes ces récentes méthodes permettent d'identifier les RBP à l'échelle d'une cellule entière. Une fois identifiées comme RBP, il existe des méthodes classiques pour cartographier les RBD de ces RBP nouvellement identifiées, telles que la mutagénèse combinée au retard sur gel par exemple ou encore le CLIP (« *crosslinking and immunoprecipitation* »). Le CLIP est l'une des approches

expérimentales utilisée en laboratoire pour identifier et caractériser les interactions ARN-RBP *in vivo*. Cette technique, dévoilée par Ule et al. en 2003 est basée sur le couplage covalent aux UV, comme pour les cCL expliqués précédemment (Figure 4) (Ule et al., 2003, 2005). Cette méthode tire parti de la photoréactivité naturelle des bases des acides nucléiques, notamment les pyrimidines et des acides aminés en particulier Cys, Lys, Phe, Trp et Tyr à 254 nm. Ainsi, l'irradiation aux UV induit des liaisons covalentes (crosslink) entre les protéines et les acides nucléiques en contact direct (« zero » distance) mais pas entre protéine-protéine (Greenberg, 1979). Il est toutefois à noter que les bases de l'ARN et de l'ADN absorbent efficacement l'énergie délivrée par les UV, cependant les bases pyrimidiques, en particulier l'uracile, sont beaucoup plus efficacement crosslinkées aux acides aminés que les purines, ce qui fait de l'ARN une molécule plus réactive que l'ADN (Smith and Meun, 1968). L'avantage du CLIP est que les UV sont appliqués aux cellules vivantes, c'est-à-dire dans un environnement *in vivo* non perturbé avec des interactions intermoléculaires et une concentration en sels et en ions pertinentes. Les liaisons covalentes formées entre les protéines et les ARN sont irréversibles, suggérant que des conditions très stringentes peuvent être utilisées tout au long du processus de purification. Brièvement, le CLIP consiste à irradier les cellules aux UV-C (400 mJ/cm²) à 254 nm puis à les lyser. Un anticorps spécifique dirigé contre la RBP d'intérêt est ensuite utilisé pour immunoprécipiter le complexe ARN-protéine contenu dans le lysat cellulaire. Avant de mettre le lysat en présence des anticorps, il subit une digestion partielle à la RNase. Après immunoprécipitation, les complexes ARN-protéines sont marqués radioactivement à l'extrémité 5' des ARN et déposés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les ARN sont ensuite isolés et purifiés, convertis en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse, amplifiés par PCR et enfin clonés pour être séquencés afin d'identifier les séquences interagissant avec la RBP d'intérêt (Ule et al., 2005; F. C. Y. Lee & Ule, 2018).

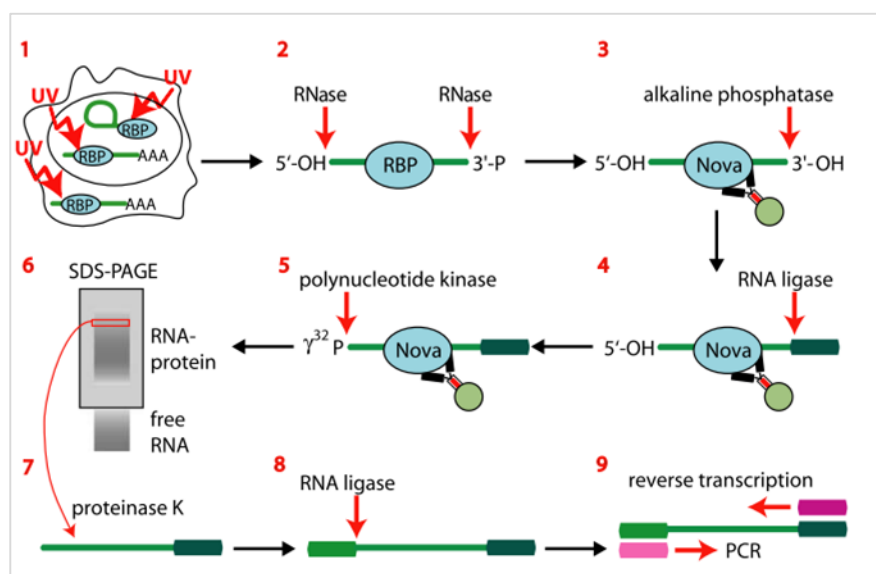


Figure 4 : La méthode de CLIP (« crosslinking and immunoprecipitation »). D'après Ule et al., 2005.

A partir de ce protocole « de base », plusieurs protocoles dérivés de l'original sont petit à petit apparus pour (i) améliorer les conditions de fragmentation de l'ARN, de purification et préparation de l'ADNc ; (ii) établir de nouvelles conditions de dénaturation pour la purification des RBP ; (iii) employer un séquençage haut débit ou encore (iv) déterminer la position exacte du site de crosslink. Toutes les modifications et nouveaux protocoles sont détaillés, en partie, dans la revue **F. C. Y. Lee & Ule, 2018**.

1.2. Les domaines classiques de liaison aux ARN

La fonction des RBP dans la régulation des gènes dépend naturellement de leur capacité à reconnaître et à se lier sélectivement aux ARN cibles au sein de la cellule. En général, les RBD individuels n'entrent en contact qu'avec quelques nucléotides et la combinaison de plusieurs RBD au sein d'une même protéine, comme souvent observé, sert à augmenter l'affinité et la spécificité de la liaison. Les RBD les plus connus et les mieux caractérisés à l'heure actuelle sont : le « *RNA recognition motif* » ou RRM, le domaine de type KH, le domaine en doigt de zinc ou ZnF et le domaine de liaison à l'ARN double-brin « *double-strand RNA-binding motif* » ou dsRBM.

1.2.1. Le « *RNA recognition motif* » ou domaine RRM

Ubiquitairement exprimé chez les eucaryotes, procaryotes et archaées, c'est le domaine le plus abondant chez les eucaryotes supérieurs (**Gerstberger, 2014**). Il est souvent retrouvé en plusieurs copies dans la même protéine et contient deux séquences hautement conservées, RNP1 et RNP2 qui permettent la reconnaissance de l'ARN *via* des résidus arginine et lysine. Il est composé de 80 à 90 acides aminés structurés en un feuillet β à quatre brins antiparallèles soutenus par deux hélices α (topologie $\beta\alpha\beta\alpha\beta$). Dans les interactions canoniques RRM-ARN, l'ARN lié s'étend sur le feuillet β et entre en contact avec un ou plusieurs résidus clés dans les motifs RNP1 et RNP2 (Arg et Lys) mais la quantité de surface du feuillet β directement en contact avec l'ARN varie considérablement (**Maris and Dominguez, 2005**). Dans les interactions non canoniques RRM-ARN, l'ARN peut interagir avec des régions en boucles ou des acides aminés en N- ou C-terminal du domaine RRM. Parfois même, la surface du feuillet β n'est pas du tout impliquée dans la liaison avec l'ARN (**Daubner et al., 2013**). Un RRM peut reconnaître de 4 à 8 nucléotides maximum, cependant la spécificité de liaison à l'ARN est augmentée par la présence de plusieurs copies de RRM dans une même RBP.

1.2.2. Le « *hnRNP K homology domain* » ou domaine KH

Les domaines KH ont été nommés ainsi après la découverte du membre fondateur de la famille hnRNP (hnRNP K) (**Siomi et al., 1993**). Comme le RRM, ils sont également largement exprimés chez toutes les espèces, dont plusieurs dizaines de membres sont codés par le génome des métazoaires. Les

domaines KH lient aussi bien l'ARN que l'ADN simple brin (Valverde et al., 2008). Ils ont une taille d'environ 70 acides aminés et lient l'ARN à l'intérieur d'un sillon composé de deux hélices α , une boucle à séquence variable contenant le motif conservé GXXG (X étant n'importe quel acide aminé) et un feuillet β . Le motif conservé au centre de la boucle peut reconnaître quatre nucléotides stabilisés par des liaisons hydrogènes, hydrophobes et électrostatiques (Valverde et al., 2008). Enfin, les domaines KH sont souvent combinés ensemble pour améliorer l'affinité et la spécificité de la liaison avec l'ARN.

1.2.3. Le « *zinc finger domain* » ou domaine ZnF

Les domaines ZnF ont la propriété d'utiliser le zinc pour lier aussi bien l'ADN que l'ARN. Il existe plusieurs types de motifs en doigt de zinc contenant des résidus cystéine et des résidus histidine. Le motif contenant trois cystéines et une histidine (CCCH), qui coordonne l'ion zinc pour former le module à doigt de zinc, lie plus spécifiquement l'ARN. Le génome humain code pour environ 60 protéines possédant le motif CCCH. La reconnaissance de l'ARN par ces protéines est permise grâce à des liaisons hydrogènes qui d'abord induisent une courbure de l'ARN, autorisant ensuite la formation d'autres liaisons hydrogènes entre l'ARN et la protéine. La présence d'un linker de 18 nucléotides dans le motif CCCH permet de faciliter la courbure de l'ARN. Le module en doigt de zinc lie la séquence UAUU (contenue dans les séquences des transcrits contenant des éléments riches en AU (ARE)) (Hall, 2005).

1.2.4. Le « *double-strand RNA-binding domain* » ou dsRBD

Ces domaines sont impliqués dans divers aspects de la régulation post-transcriptionnelle des gènes, incluant l'édition et la localisation des ARN, et la biogénèse des micro-ARN. Le génome humain code pour 18 protéines contenant des dsRBD. Ils sont composés de 65-70 acides aminés et consistent en deux hélices α plaquées contre un feuillet β à trois brins antiparallèles (topologie $\alpha\beta\beta\alpha$). Les deux hélices α et la boucle entre deux brins β sont impliqués dans la liaison à l'ARN. Il est généralement supposé que les dsRBD ne reconnaissent que la forme double-brin de l'ARN et ne sont pas spécifiques d'une séquence (Barraud, 2013). Cependant, ils reconnaissent des cibles ARN spécifiques, pouvant suggérer la reconnaissance de mésappariements ou de renflements dans les duplexes ARN.

Il a été montré que parmi les 1500 RBP mises en évidence à ce jour, près de 55% d'entre elles ne contiennent aucun des RBD connus (Figure 5) (Beckmann et al., 2016). Aussi, 27% ne contiennent ni de RBD classique, ni de fonction connue en rapport avec la biologie des ARN (Beckmann et al., 2015). Comparativement aux trois plus abondants domaines de liaison à l'ADN présents dans 80% de tous les facteurs de transcription, les trois plus abondants RBD ne sont présents que dans 20% de toutes les RBP. Ceci suggère qu'il existe d'autres domaines/motifs de liaison à l'ARN responsables aussi de la complexité et de la diversité humaine. En fait, l'un des autres générateurs possibles de complexité fonctionnelle est

l'existence de régions intrinsèquement désordonnées (IDR) se liant à l'ARN et possédant des fonctions variables. Ainsi, une grande partie des nouvelles RBP non conventionnelles comporte des IDR (Beckmann et al., 2016).

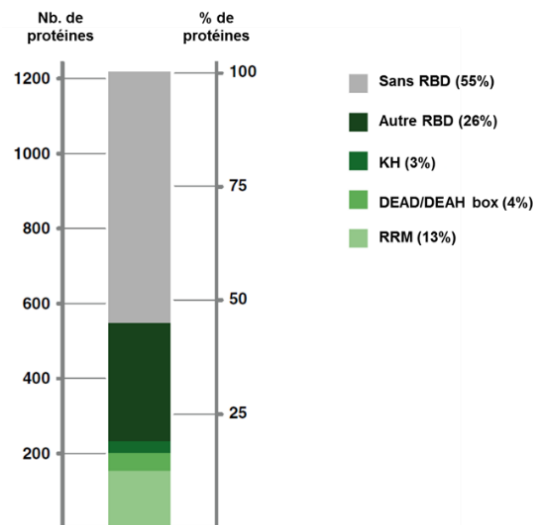


Figure 5 : Pourcentage de protéines identifiées en RNA-IC ne possédant pas de RBD connus. Le RNA-IC appliqué à différentes lignées cellulaires montre que pour un total de 1218 protéines identifiées comme des protéines liant l'ARN, environ 55% d'entre elles ne possèdent pas de RBD identifiable. Réadapté de Beckmann et al., 2016.

1.3. Les domaines associés aux RBP intrinsèquement désordonnées

Une protéine est considérée intrinsèquement désordonnée lorsqu'elle possède une région classifiée de désordonnée de plus de trente acides aminés (Tompa et al., 2009). Ceci leur confère une conformation plus ou moins instable et leur permet d'engager différentes structures afin de répondre de manière dynamique et rapide aux conditions changeantes de la cellule. Les caractéristiques typiques des protéines intrinsèquement désordonnées (IDP) sont une faible hydrophobie et une charge nette élevée, importante pour les interactions électrostatiques (Uversky, 2019). Comme pour les RBD classiques, la multiplicité des motifs de liaison à l'ARN compense la faible affinité du motif unique.

A l'état natif, les régions désordonnées adoptent une conformation étirée, sans caractéristique structurale particulière, mais lors de la liaison d'un ligand, elles peuvent subir un repliement induit (« *induced folding* »), appelé la transition désordre vers ordre (« *disorder-to-order-transition* ») (Varadi et al., 2015). Ceci suggère que les chaînes protéiques qui ont une capacité de liaison avec l'ARN seraient moins stables sous forme non liée, mais stabilisées par la liaison avec l'ARN (Varadi et al., 2015). Il peut être envisagé que lorsqu'un ARN hautement structuré est impliqué dans une liaison, cette transition se produit avec un transfert d'entropie, entraînant un déploiement partiel de l'ARN. De la même manière, une modification post-transcriptionnelle telle que la phosphorylation ou la méthylation peut imposer un changement structurel et moduler l'affinité protéine-ARN. Par exemple, la

phosphorylation du facteur d'épissage SRSF1 déclenche le repliement de sa région protéique riche en arginine/sérine (RS) (Xiang et al., 2013).

Les motifs désordonnés de liaison à l'ARN dans les RBP sont des motifs ayant une séquence désordonnée en acides aminées définie. Il s'agit souvent de segments d'acides aminés de faible complexité et répétitifs (Castello et al., 2012). Ces motifs peuvent potentiellement coopérer avec des RBD classiques et jouer divers rôles biologiques. Le plus souvent sont retrouvées dans les RBP les répétitions RG (arginine/glycine) et RGG (arginine/glycine/glycine), les motifs riches en RS (arginine/sérine), les motifs courts linéaires (*short linear motifs* ou SLiMs), et les long segments K/R (lysine/arginine), détaillés ci-après (Castello et al., 2012).

1.3.1. Les répétitions RG/RGG

Au sein des séquences répétées dans les RBP, l'arginine (R) est souvent associée à la glycine (G), formant l'arginine-glycine-glycine box (RGG box ou domaine GAR). Ces motifs possèdent au moins deux à trois répétitions RG/RGG séparés par dix acides aminés. En fait, c'est un des motifs les plus retrouvés dans le génome humain. La taille et le nombre de ces motifs varient, mais ils sont souvent retrouvés combinés à un RBD connu et d'autres motifs répétés désordonnés. Les propriétés, activités et fonctions de ces motifs peuvent être régulées par la méthylation des arginines par les méthyltransferases (PRMT), dont elles sont la cible préférentielle (Thandapani et al., 2013). Par exemple, la méthylation du motif RGG présent dans la région C-terminale de l'hélicase DDX5 par PRMT5 induit son association avec une exoribonucléase XRN2 pour permettre la dégradation des R-loops présentes à proximité des sites poly(A) et ainsi libérer l'ARN polymérase II associée à la terminaison de la transcription (Mersaoui et al., 2019). Il a également été montré que les arginines contenues dans le domaine GAR de 53BP1, une protéine clé de la signalisation des dommages de l'ADN, sont méthylées par PRMT1. Ceci facilite la relocalisation de 53BP1 aux sites de dommages de l'ADN et sa liaison directe à l'ADN (Boisvert et al., 2005). Les propriétés de liaison à l'ARN des motifs RG/RGG sont encore mal définies et c'est un motif dont la spécificité de liaison varie en fonction de la séquence et de la structure de l'ARN. Par exemple, le domaine RG/RGG de FMRP (protéine du syndrome de l'X fragile, qui reconnaît l'ARN *sc1*) se liera de manière plus affin à une structure en G-quadruplex (*sc1*) plutôt qu'à un ARN ayant une structure secondaire complexe ou à un simple ARN double-brin (Ozdilek et al., 2017; Phan et al., 2011). Ici, les deux arginines 533 et 538 de FMRP forment des contacts intermoléculaires avec la jonction du G-quadruplex, et la glycine entre les arginines servent de charnière flexible (Phan et al., 2011). Ceci montre clairement le rôle du motif RG/RGG de FMRP dans la reconnaissance d'une structure d'ARN (et non d'une séquence). Enfin, les protéines contenant les motifs RG/RGG régulent tous les niveaux du métabolisme de l'ARN.

1.3.2. Les motifs riches en RS

L'arginine est également souvent retrouvée avec la sérine (S) dans les motifs désordonnés répétés. Les protéines qui les possèdent sont les protéines SR et SR-like, dont le groupe le plus important sont les facteurs d'épissage des ARN pré-messagers. Ces facteurs se lient à des séquences activatrices d'épissage dans les exons et stimulent l'excision des introns adjacents. Ces protéines contiennent un domaine RRM à l'extrémité N terminale et un domaine riche en RS à l'extrémité C-terminale pouvant aussi directement lier l'ARN (Jeong, 2017). L'efficacité de l'épissage dépend de la longueur de la répétition du motif RS et peut être modifiée par la phosphorylation de ce motif. Cette modification permet la transition désordre intrinsèque vers une structure en forme d'arche, influençant les propriétés de liaison avec l'ARN. Ce phénomène peut être observé dans le cas de la protéine SRSF1 et l'hélicase DDX3 (Xiang et al., 2013). Les protéines contenant des motifs SR sont également impliquées dans d'autres processus que l'épissage tels que l'export d'ARNm, la traduction et la stabilité pour la maintenance de la stabilité du génome (Jeong, 2017).

1.3.3. Les « *short linear motifs* » ou SLiM

Les SLiM sont composés de dix acides aminés maximum à l'extérieur de domaines protéiques (Neduva and Russell, 2005). Ils se lient à l'ARN avec une faible affinité mais la spécificité de liaison est obtenue grâce à leur grand nombre au sein de la protéine. En cas de modification post-transcriptionnelle de ces motifs, leur spécificité de liaison peut être modifiée ce qui leur permet d'agir en tant que commutateurs moléculaires, par exemple.

1.3.4. Les longs segments K/R

Ces motifs sont composés de quatre à huit lysine ou arginine, formant une surface hautement positive. Ils sont très abondants dans les RBP non conventionnelles et peuvent être logés n'importe où dans les RBP, le plus souvent adjacent aux domaines globulaires, probablement dans le but de coopérer avec eux dans la liaison avec l'ARN (Järvelin et al., 2016).

Il est donc clairement établi que les RBP parviennent à lier l'ARN à travers des domaines de liaison structurés classiques mais également à travers des séquences intrinsèquement désordonnées et souvent de faible complexité en acides aminés.

L'expression aberrante et/ou la fonction altérée des RBP dans les pathologies sont très documentées. (pour revues Cooper et al., 2009; Hong, 2017; C. Kim, Kang, Lee, & Lee, 2017; Lukong, Chang, & Khandjian, 2008; Salem, Vonberg, Borra, Gill, & Nakamura, 2019). Par exemple, une forte

expression de RBP dans le cerveau est une cause importante de développement de maladies neurodégénératives. La perte de RBP ou l'expression d'ARN toxiques sont impliquées dans le développement de nombreux troubles neurologiques (Hong, 2017). De nombreuses RBP ont été identifiées comme des acteurs clés dans le développement et la progression des cancers. Elles peuvent modifier radicalement la croissance et la prolifération cellulaire. L'expression aberrante des RBP est également fortement associée aux taux de survie des patients atteints de cancer. Ainsi, la question maintenant est de savoir si les régions intrinsèquement désordonnées contribuent au comportement pathologique des RBP. Il est probable que le regroupement aberrant et les effets de perte/gain de fonction de ces régions peuvent être une caractéristique commune dans les pathologies, ce qui souligne l'importance d'avoir un certain « degré » de désordre et de sa régulation dans la transition désordre vers ordre.

2. La réponse aux dommages de l'ADN

Toute forme de vie doit transmettre son matériel génétique intact à la génération suivante. Ceci doit être accompli malgré les agressions constantes de l'ADN par des agents endogènes et environnementaux. Ces lésions peuvent bloquer, si elles ne sont pas ou mal réparées, la réplication de l'ADN et la transcription des gènes, provoquant des mutations et des aberrations dans le génome à plus grande échelle menaçant la viabilité des cellules. Pour contrer ces menaces, les cellules activent un ensemble de voies de signalisation complexes, regroupées sous le terme de réponse aux dommages de l'ADN (« *DNA damage response* » ou DDR), pour détecter, signaler et assurer la réparation des dommages de l'ADN (Figure 6). Ainsi, dans ce chapitre seront passées en revue les principales sources de dommages et leurs effets directs sur la molécule d'ADN, leur signalisation, leur mécanisme de réparation approprié ainsi que des exemples de pathologies associées à un défaut de réparation.

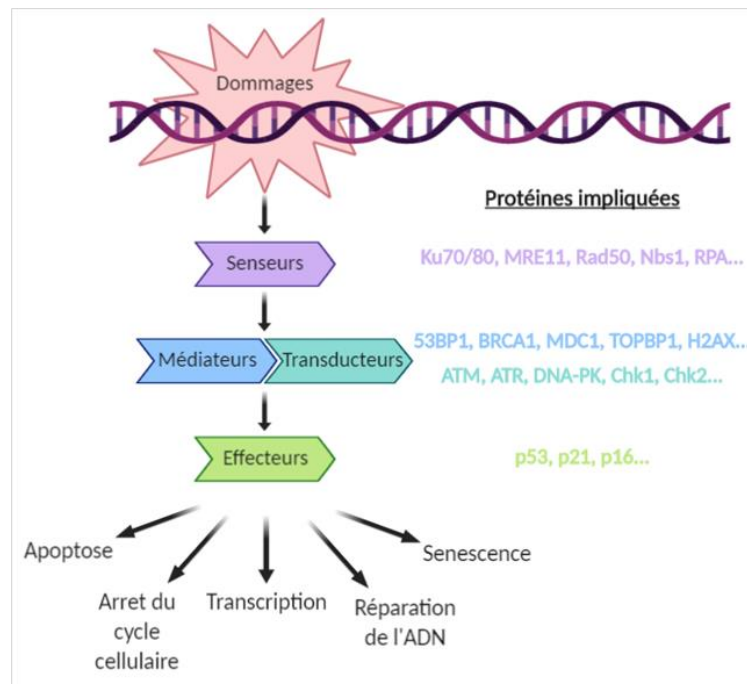


Figure 6 : La réponse aux dommages de l'ADN (« DNA damage response » ou DDR). Le DDR est un ensemble de voies de transduction du signal activées en réponse aux dommages de l'ADN. Il implique de nombreux composants moléculaires dont des senseurs de dommages (MRE11, RPA...), des médiateurs (53BP1, BRCA1...), des transducteurs (ATR, ATM...) et des effecteurs (p53...) qui sont recrutés de manière hiérarchique pour assurer la réparation de l'ADN. L'activation de cette cascade de signalisation peut aboutir à la mort cellulaire par apoptose, ou à un arrêt transitoire du cycle cellulaire suivie de la réparation des dommages et la transcription de gènes de réponse aux dommages de l'ADN ou encore à la sénescence en cas de persistance de dommages à l'ADN.

2.1. Nature et origine des dommages de l'ADN

Chacune des 10^{13} cellules du corps humain subit des dizaines de milliers de lésions de l'ADN par jour. Ces dommages sont induits par une variété de facteurs intrinsèques à la cellule, le plus souvent liés à un défaut de la réplication de l'ADN, ainsi que par des facteurs extrinsèques liés directement à l'environnement cellulaire tels que les radiations ionisantes ou les agents chimiques utilisés en médecine. Généralement, les lésions induites à l'ADN sont des modifications et mésappariements de bases, des pontages inter- et intrabrin et des cassures simple- ou double-brin (SSB et DSB respectivement). Ces dernières, bien que se produisant moins fréquemment que les autres types de lésions, sont beaucoup plus délétères pour la cellule car très toxiques et difficiles à réparer, en particulier les DSB.

2.1.1. Les sources exogènes des lésions de l'ADN

Les sources exogènes des lésions de l'ADN sont des facteurs extrinsèques à la cellule. Il s'agit de facteurs environnementaux pouvant être de deux types : physique ou chimique (Ciccia and Elledge, 2010).

Les agents génotoxiques physiques les plus couramment rencontrés par les cellules sont les radiations ionisantes (« *ionising radiations* » ou IR) et les rayonnements ultraviolets (UV). Selon la dose et la provenance des rayonnements (cosmiques, traitements médicaux utilisant des rayons-X ou radiothérapie), les IR peuvent induire des altérations et des pertes de bases (formation de sites abasiques), modifier les sucres de l'ADN, générer des SSB ou des DSB. Les irradiations de type gamma et X, utilisées en médecine, induisent des dommages biologiques plus importants que les irradiations de type alpha ou beta. Ils peuvent avoir des effets directs sur la molécule d'ADN mais également générer rapidement, par radiolyse de l'eau, des espèces réactives de l'oxygène tels que le radical hydroxyle (OH) qui va attaquer la molécule d'ADN, ce sont les effets indirects de l'ionisation (**Aust and Eveleigh, 1999; Cadet and Richard Wagner, 2013**). Les UV, en particulier les UV-B (les plus agressifs pour l'ADN) induisent des dimères de pyrimidine, c'est-à-dire la formation d'une liaison covalente entre deux pyrimidines adjacentes. Ils sont de deux types : les dimères cyclobutyliques de pyrimidine dits CPD et les photoproduits 6,4 dits 6-4PP (**Cadet and Richard Wagner, 2013**). Ces dimères créent une distorsion de la double hélice qui bloque la progression des ADN polymérase lors de la réplication ce qui peut être à l'origine de la formation de cassures double-brin. Ils sont fortement liés à l'étiologie du cancer de la peau.

Les agents génotoxiques chimiques sont principalement ceux utilisés en chimiothérapie. Ils induisent le plus souvent des lésions assez conséquentes sur l'ADN pouvant conduire à l'apoptose des cellules ou à l'activation des voies de réparation pour le maintien de la prolifération des cellules tumorales. On retrouve entre autres les agents alkylants (methyl methanesulfonate ou MMS, temozolomide), les agents créant des liaisons covalentes (crosslink) intra- ou interbrins (mitomycyn C, cisplatine, psoralen, moutardes azotées), et les inhibiteurs de topoisomérase (camptothécine, etoposide)(**Ciccia and Elledge, 2010**). Les crosslinks interbrins dans l'ADN, particulièrement dangereux, ralentissent fortement la réplication de l'ADN voire l'empêchent. Par exemple, les moutardes azotées forme des ponts interbrins, les sels de platine forment des crosslink principalement intrabrins et courbures/déroulements plus ou moins importants de l'ADN, et la mitomycine C se lie à l'ADN sous forme d'adduits mono- ou bivalent inter ou intrabrins pour induire une distorsion de l'ADN. Les inhibiteurs de topoisomérase (enzymes assurant la condensation/décondensation de l'ADN et la coupure transitoire des deux brins puis leur ligation) quant à eux bloquent le site catalytique de l'enzyme, ainsi, ils stabilisent leur fixation à l'ADN et empêchent l'étape de religation, provoquant une coupure définitive des deux brins (SSB ou DSB). Enfin, certains agents comme l'hydroxyurée, un inhibiteur de la ribonucléotide réductase, induisant une inhibition de la synthèse de dNTP durant la phase S, sont utilisés pour empêcher indirectement la progression de la fourche de réplication et induire un stress de réplication global. Selon la dose appliquée et la durée du traitement, la fourche de

réplication peut soit uniquement s'arrêter et reprendre sa course lorsque le pool de dNTP est de nouveau normal, soit induire des DSB et dans ce cas, la fourche de réplication devient dysfonctionnelle (Vesela et al., 2017).

2.1.2. Les sources endogènes des lésions de l'ADN

Des dommages de l'ADN peuvent être générés spontanément par le métabolisme de l'ADN lui-même ou induits lors de processus physiologiques normaux se produisant à l'intérieur de la cellule. Ce sont généralement des lésions spontanées affectant un seul brin de la double hélice d'ADN. On retrouve entre autres (Ciccia and Elledge, 2010; Helena et al., 2018) :

- la perte de bases d'ADN après des dépurinations (et plus rarement des dépyrimidations). Ces phénomènes sont dus à la rupture de la liaison glycosidique entre une purine (ou une pyrimidine) et le désoxyribose auquel elle est attachée. La base libérée laisse derrière elle un site vacant, dit site AP ou site abasique. Au cours de la réplication, les sites apuriques ainsi produits ne peuvent plus spécifier la base complémentaire de la purine d'origine.
- l'interconversion entre les bases d'ADN causée par la désamination des cytosines, par exemple. Il s'agit d'une hydrolyse de la cytosine, produisant de l'uracile. Les résidus d'uracile s'apparieront avec l'adénine au cours de la réplication, induisant la conversion d'une paire de G-C en une paire de A-T (transition de base). La désamination peut être corrigée par le retrait de l'uracile générant ainsi un site abasique.
- les oxydation des bases et les cassures de l'ADN générées par des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le métabolisme oxydatif est une des principales sources endogènes de lésions à l'ADN. Au cours du métabolisme oxydatif, les radicaux hydroxyles (OH) et peroxyde (H₂O₂) sont libérés normalement et attaquent les bases de l'ADN. La guanine possède le plus bas potentiel d'ionisation, ce qui fait d'elle la principale cible des ROS devant l'adénine, la thymidine puis la cytosine. L'oxydation de la guanine génère le 8-oxo-7,8-dihydroguanine (ou 8oxoG). C'est le produit le plus abondant et le plus stable des dommages oxydatifs de l'ADN, faisant de lui un important acteur de mutagénèse et de carcinogénèse (Fortini et al., 2003).
- les mauvaises incorporation de dNTP lors de la réplication.

Etant donné l'importance de la réplication de l'ADN, qui permet la duplication fidèle de l'information génétique à transmettre à la génération suivante, la section qui suit sera consacrée à la description du mécanisme de réplication. Puis seront détaillés les dispositifs existant au sein des cellules permettant d'éviter l'incorporation d'erreurs dans l'ADN et de surcroit un stress réplcatif. Enfin, une dernière section sera consacrée au stress réplcatif et sa prise en charge par les cellules.

2.1.2.1. La réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN est un mécanisme hautement conservé chez tous les organismes. C'est un processus central pour la division cellulaire et sa fidélité constitue un enjeu de taille dans la stabilité des génomes. C'est également un mécanisme complexe qui nécessite l'action coordonnée et très régulée de nombreuses machineries moléculaires, regroupées sous le terme de « réplisome ».

La réplication de l'ADN est initiée à partir de régions précises du génome appelées origines de réplication (ORI). Elles sont reconnues par un complexe protéique ORC (« *Origin Replication Complex* ») en fin de mitose et en phase G1. Chez les mammifères, il existe plusieurs ORI réparties le long des chromosomes. Elles sont activées séquentiellement dans l'espace et dans le temps pendant la phase S (**Fragkos et al., 2015; Takebayashi et al., 2017**). Toutes les ORI sont autorisées avant la phase S mais beaucoup d'entre-elles (70-80%) ne sont pas activées et constituent les origines dormantes utilisées pour secourir les fourches de réplication bloquées lors d'un stress répliatif par exemple (**Courtot and Hoffmann, 2018**). Dans les conditions normales, les origines dormantes sont répliquées passivement par la fourche provenant d'une autre origine activée adjacente. Chez l'Homme, les ORI ne sembleraient pas avoir de séquence nucléique particulière pour leur reconnaissance par l'ORC (**Vashee et al., 2003**).

Le processus de réplication de l'ADN se divise en trois étapes (décrite ci-après) : i) l'initiation de la réplication aux origines de réplication, ii) la synthèse d'ADN aux fourches de réplication ou élongation et iii) la terminaison de la réplication au site où deux fourches de réplication convergentes se rencontrent.

- L'initiation de la réplication

En fin de phase M et en début de phase G1, le complexe ORC, composé de 6 sous-unités (ORC1 à 6) et possédant une activité ATPasique, est recruté aux origines de réplication et y restera pendant toute la durée du cycle cellulaire (**Figure 7**). Puis les ATPases Cdc6 et Cdt1 vont fixer l'ORC, ce qui va permettre de recruter deux complexes MCM2-7 (« *minichromosome maintenance* ») contenant l'activité hélicase. Le complexe pré-RC est ainsi formé et les origines de réplication sont dites autorisées ou « *licensed* » (**Fragkos et al., 2015**). A ce stade, les complexes MCM2-7 ne sont pas actifs, ce sont deux double hexamères qui entourent l'ADN double brin. A la transition de phase G1/S, l'activation des origines de réplication implique la dissociation des deux hexamères pour former les deux réplisomes et donc les deux fourches de réplication distinctes (**Fragkos et al., 2015**). Cette dissociation est rendue possible grâce à la phosphorylation du complexe MCM par les kinases DDK et CDK permettant ainsi le recrutement et la formation du complexe CMG, comprenant Cdc45, les complexes MCM et GINS (**Heller et al., 2011**). Le complexe de pré-initiation (pré-IC) est ainsi formé. Les kinases CDK phosphorylent également l'hélicase RecQL4 qui, avec MCM10, va participer à la formation du complexe CMG (**Im et al.,**

2009; Thu and Bielinsky, 2013). Elles phosphorylent aussi la polymérase epsilon ($Pol\epsilon$) et la treslin pour promouvoir son interaction avec TopBP1, une protéine indispensable à l'activation du complexe CMG (ils se lient à MCM) (Kumagai et al., 2010). Après être assemblé et activé, le complexe CMG va dérouler/relaxer l'ADN double-brin et va s'en suivre le recrutement d'autres protéines telles que RFC, PCNA, RPA et d'autres ADN polymérases ($Pol\alpha$ et $Pol\delta$) qui vont convertir le complexe pré-IC en deux fourches de réplication se dirigeant dans une direction opposée (Fragkos et al., 2015). A ce stade, la synthèse d'ADN peut alors débuter.

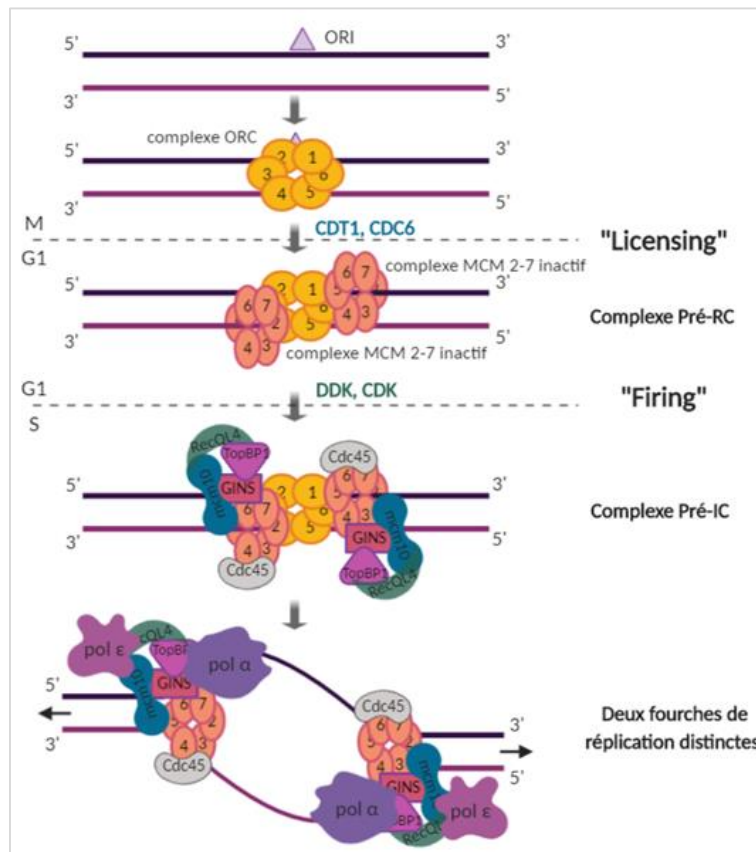


Figure 7 : Les différentes étapes de l'initiation de la réplication.

Ces deux étapes successives de la reconnaissance du complexe pré-IC puis de l'activation de la synthèse d'ADN permettent d'éviter la re-réplication dans le même cycle cellulaire. Ceci est permis d'une part grâce aux kinases CDK qui vont phosphoryler MCM et l'ORC pour éviter la réactivation des origines et d'autre part par l'action de Geminin qui va fixer Cdt1 et ainsi empêcher la formation du complexe pre-RC après le recrutement de MCM2-7. Le but est d'activer une seule fois une origine de réplication par cycle cellulaire (Fragkos et al., 2015; Wu et al., 2014).

- L'élongation de la réplication

La duplication de l'ADN se fait de manière semi-conservative. Du fait de la nature antiparallèle des brins de la double hélice d'ADN et du sens de polymérisation des ADN polymérases, les brins d'ADN

vont être néosynthétisés différemment. Le brin précoce va être synthétisé dans la même direction que la progression de la fourche de réplication et le brin tardif dans la direction opposée, de manière discontinue (Figure 8) (Kang et al., 2018).

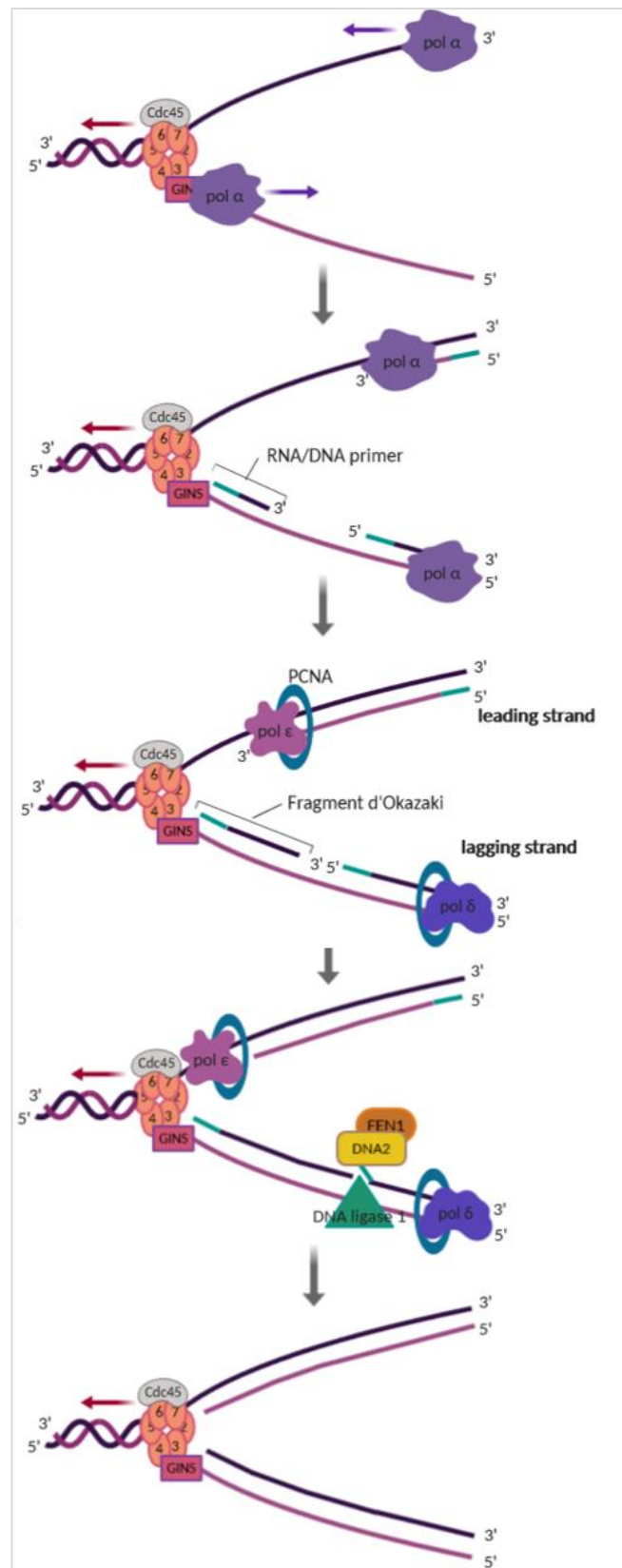


Figure 8 : Les différentes étapes de l'élongation de la réplication.

Parmi les quinze ADN polymérases recensées chez l'Homme, trois participent activement à la réplication normale de l'ADN. Il s'agit des ADN polymérases alpha (α), epsilon (ϵ) et delta (δ) (Pol α , Pol ϵ et Pol δ). Les polymérases répliquatives contiennent plusieurs sous unités, la plus grande étant la sous unité catalytique responsable de la synthèse de l'ADN, dans le sens 5' vers 3' (**Johansson and Dixon, 2013**). La polymérase qui amorce la synthèse des deux brins d'ADN est Pol α , aussi appelée complexe Pol α -primase. Elle est composée de deux sous-unités polymérases (catalytique Pol1/POLA1 et régulatrice Pol12/POLA2) et deux sous-unités primases (catalytique Pri1/PRIM1 et régulatrice Pri2/PRIM2) (**Jain et al., 2018**). Dans un premier temps, Pri1/PRIM1 démarre la synthèse de l'ADN *de novo* en générant une courte matrice de ribonucléotides (ARN) longue de 7 à 12 nucléotides (nts) sur chaque brin d'ADN en position 5'. Ensuite Pol1/POLA1 incorpore un nombre limité de désoxyribonucléotides (20-25 nts) à la suite de l'amorce d'ARN ; l'amorce ARN/ADN initiatrice est alors créée (**Lujan et al., 2016**). Les ADN polymérases poursuivant la synthèse d'ADN sont différentes pour le brin précoce et le brin tardif :

- Synthèse du brin précoce :

Sur le brin précoce (« *leading strand* »), la formation de l'amorce ARN/ADN est suivie de la synthèse d'ADN par Pol ϵ . En raison de sa processivité et de son association avec PCNA, Pol ϵ peut synthétiser l'ADN en continu (**Kang et al., 2018; Waga and Stillman, 1998**).

- Synthèse du brin tardif :

Sur le brin tardif (« *lagging strand* »), Pol δ synthétise environ 100 nts après l'amorce ARN/ADN (jusqu'à la prochaine amorce) pour former les fragments d'Okazaki. La maturation de ces derniers (élimination de l'amorce et ligature des fragments) peut se faire *via* deux voies. La principale est appelée la voie du « short flap » (**Figure 9**, gauche). Ici, du fait de l'amorçage rapide des fragments d'Okazaki, Pol δ rencontre régulièrement le fragment d'Okazaki situé en aval, l'obligeant à déplacer son amorce ce qui induit une courte (inférieure à 10 nts) structure « à rabat » (ou flap 5') (**Balakrishnan and Bambara, 2013a**). Comme Pol δ ne possède pas d'activité endonucléase pour cliver le flap, c'est l'endonucléase FEN1, qui, après reconnaissance de la matrice déplacée, va la cliver à la base, créant un substrat pour l'ADN ligase 1 qui va sceller la coupure générée par FEN1 et ainsi créer un ADN double brin continu entièrement fonctionnel (**Balakrishnan and Bambara, 2013b; Lieber, 1997**). Dans certains cas, FEN1 se désengage temporairement du complexe de réplication (on ignore encore la raison), ce qui entraîne un retard de clivage suffisant pour que les flap déplacés par Pol δ deviennent longs (voie du « long flap ») (**Figure 9**, droite). Lorsque les flap mesurent au moins 22 nts de long, RPA s'y fixe et les flap deviennent réfractères à l'action de FEN1. C'est la nucléase/hélicase DNA2 qui est responsable de leur clivage. DNA2 déplace RPA et raccourcit progressivement le flap (**Zhou et al., 2015**). A ce stade, soit DNA2 se dissocie en raison de sa faible affinité pour les flap courts soit c'est FEN1 qui retire DNA2 de l'ADN (**Gloor**

et al., 2012). L'ADN devient à nouveau le substrat de FEN1 puis l'action de l'ADN ligase 1 permet la formation du double brin continu.

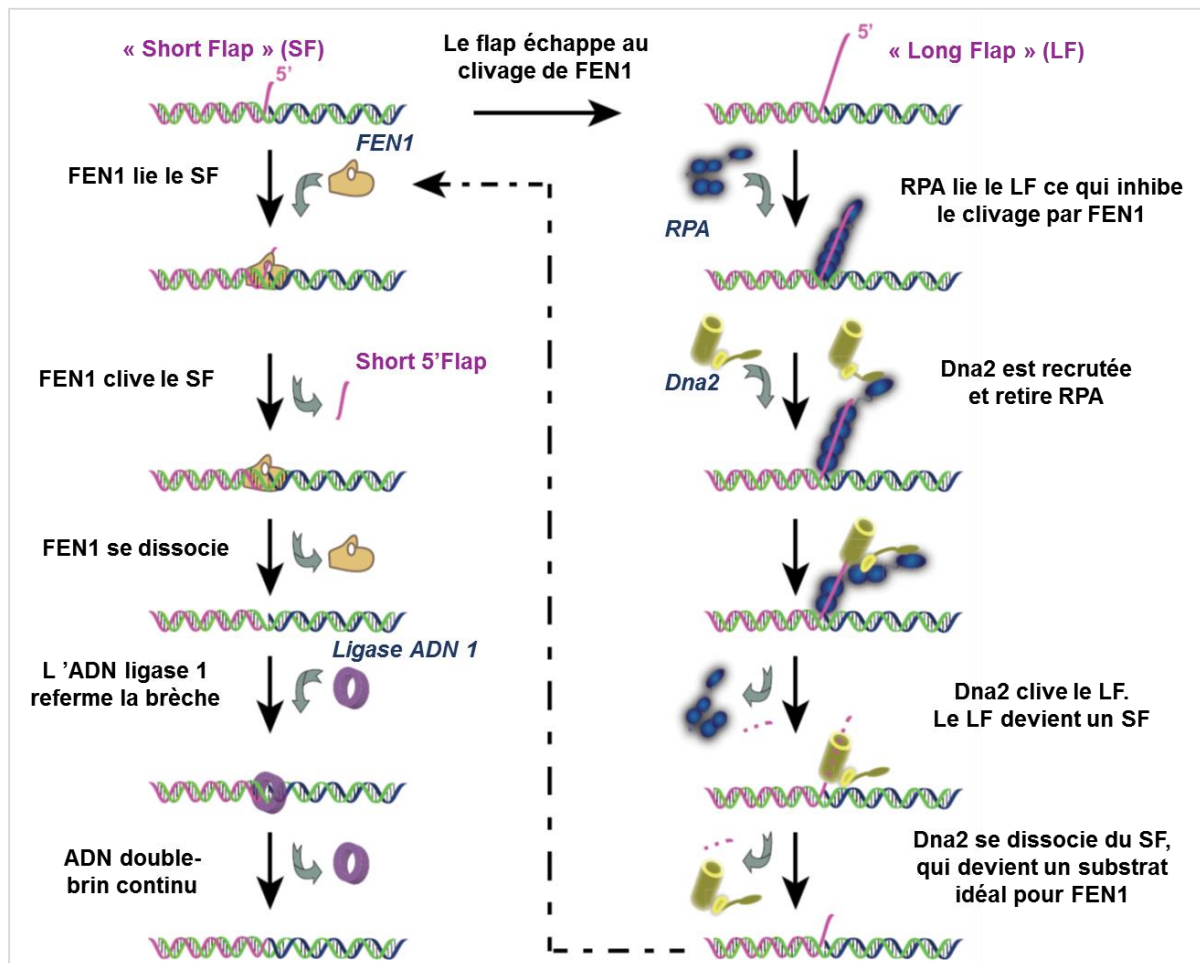


Figure 9 : Les voies du « short flap » et du « long flap ». Réadapté de Zaher et al., 2018.

Il est à noter que chaque fragment d'Okazaki a une longueur d'environ 200 nucléotides, c'est-à-dire que pour préparer chaque division cellulaire, pas moins de dix millions de fragments doivent être synthétisés et joints (Balakrishnan and Bambara, 2013a). Ainsi un défaut de la maturation des fragments d'Okazaki peut avoir des conséquences graves. Chez l'Homme, les mutations qui induisent des altérations fonctionnelles dans la maturation des fragments d'Okazaki existent. Ces défauts subtils n'affectent pas ou peu la croissance et le développement mais entraînent l'accumulation d'instabilités génétiques, conduisant à l'apparition précoce de cancers (Zheng et al., 2007, 2011, 2019).

Enfin, pendant l'élongation, la processivité des polymérase δ et ϵ dépend de la présence de PCNA. Cette protéine est un homotrimère en forme d'anneau qui lui permet d'entourer et de coulisser le long du brin d'ADN en cours de répllication. Le recrutement de PCNA sur la partie ADN de l'amorce ARN/ADN synthétisée par Pol α est permis grâce au complexe de chargement RFC (Boehm et al., 2017; March et al., 2017).

- La terminaison de la réplication

Après la réplication de l'ADN, les protéines du réplisome doivent se dissocier de la chromatine pour empêcher un recrutement de protéines inappropriées et promouvoir la progression correcte du cycle cellulaire. La terminaison de la réplication survient lorsque deux fourches de réplication se rencontrent (**Figure 10**). Le complexe CMG d'une fourche de réplication rencontre le dernier fragment d'Okazaki de la fourche opposée, passe l'extrémité 5' et se déplace sur l'ADN double brin. Les complexes CMG sont libérés uniquement après que l'espace entre le brin retardé d'une fourche et le brin précoce de l'autre soit comblé et ligaturé et que les tensions topologiques entre les chromatides sœurs (décaténation) soient libérées (**Dewar and Walter, 2017**). D'un point de vue moléculaire, le désassemblage des complexes CMG de la chromatine est permise grâce à la polyubiquitinylation de la sous-unité MCM7 du complexe MCM2-7 (**Kang et al., 2018**). Les protéines responsables de la polyubiquitinylation ne sont pas clairement identifiées chez les mammifères. Cependant, chez *C. elegans* et chez le Xénope, des études récentes montrent qu'il semblerait que ce soit l'E3 ubiquitine ligase CRL2^{Lrr1} qui ubiquitinye MCM7 ce qui permet à l'ATPase Cdc48/p97/VPC de retirer le complexe CMG de la chromatine (**Bell, 2014; Dewar et al., 2015**). La question qui reste en suspens est : quels sont les signaux informant la cellule que la réplication est achevée ?

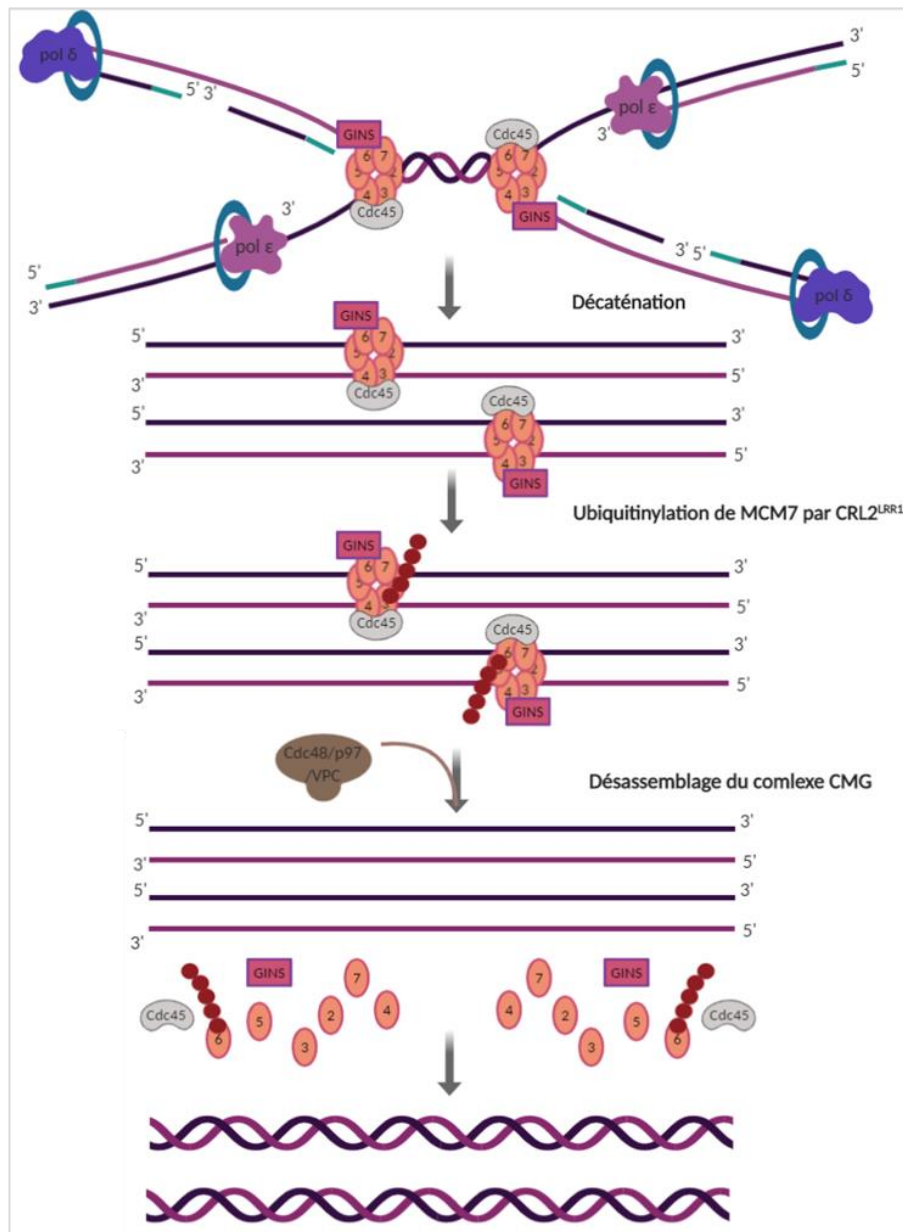


Figure 10 : Les différentes étapes de terminaison de la réplication de l'ADN.

2.1.2.2. Les erreurs de réplication et leur prise en charge

L'ADN transmis aux cellules filles doit être répliqué avec une extrême précision pour le maintien de l'intégrité du génome. Ceci est permis grâce à la très grande fidélité de réplication des ADN polymérase répliquatives Pol α , Pol δ et Pol ϵ . Cette fidélité, dont le taux d'erreur (i.e. un nucléotide mal incorporé) est estimé à 1×10^{-9} , repose sur trois mécanismes (Bębenek and Ziuzia-Graczyk, 2018). Le premier est la sélectivité nucléotidique. Lors de la réplication, les ADN polymérase forment un complexe avec l'ADN, puis un nucléotide est lié à l'ADN, en interaction avec les deux ions métalliques contenus dans leur site actif (Johnson, 2010). Si un nucléotide incorrect est lié, un problème de géométrie ressenti au niveau du site actif ne favorisera pas la formation d'une liaison phosphodiester

et le nucléotide partira (**Ganai and Johansson, 2016**). Ce mécanisme confère ainsi une sélectivité élevée aux polymérase répliquatives. Le deuxième mécanisme est la relecture exonucléolytique (« *proofreading* »). Il s'agit d'une activité de relecture (activité exonucléase dans le sens 3'→5', inverse de celui de la polymérisation) que possède uniquement les Pol ϵ et Pol δ et qui permet de corriger l'incorporation non appropriée d'un nucléotide à l'ADN. Cette activité exonucléase est située à proximité du site catalytique. Ainsi lors de la synthèse, l'enzyme oscille entre les deux activités. Lorsqu'un nucléotide est mal incorporé, il y a d'abord reconnaissance de celui-ci et, si besoin, son retrait grâce à l'activité exonucléase (**Bębenek and Ziuzia-Graczyk, 2018; Ganai and Johansson, 2016**). Enfin, les erreurs qui ont échappé à la relecture des polymérase sont corrigées par un système de réparation de l'ADN, le MMR (présenté plus loin, partie 2.2.1.1), qui constitue le troisième mécanisme permettant la haute fidélité de la réplication. Les erreurs de réplication qu'il cible sont les insertions, les délétions et les substitutions.

Ainsi ces trois mécanismes constituent en quelque sorte un système de « nettoyage » de l'ADN avant sa réplication complète. Cependant, certaines lésions plus complexes échappent à ce système. En effet, dues à leur capacité de relecture, les Pol δ et Pol ϵ peuvent être bloquées par des lésions de l'ADN plus ou moins complexes (sites abasiques, adduits de bases, crosslink intra et interbrin, CPD et 6-4PP...) car elles ne se combinent pas avec les nucléotides entrants et ne peuvent donc pas être hébergées dans les sites catalytiques des polymérase répliquatives. Le dysfonctionnement de la polymérase entraîne le blocage de la fourche de réplication et conduit donc à un stress de réplication (**Pilzecker et al., 2019**). Pour éviter les conséquences délétères d'une fourche de réplication bloquée, les cellules ont mis en place un mécanisme de tolérance aux dommages de l'ADN. Ce mécanisme contribue à la progression et à la stabilité de la fourche de réplication même en présence des lésions et structures bloquantes. Il y a deux modes principaux de tolérance aux dommages (**Figure 11**) (**Branzei and Psakhye, 2016**). Le premier mode, le mode commutation de modèle (« *template switching* » ou TS) est un mode dépendant de la recombinaison, n'est pas ou très peu sujet aux erreurs (« *error-free* ») et utilise un modèle homologue, la chromatide sœur nouvellement synthétisée. Le deuxième mode est la synthèse translesionnelle (« *translesion synthesis* » ou TLS), c'est-à-dire à travers la lésion et qui est souvent sujette aux erreurs (« *error-prone* »). Il est donc associé à un risque important de mutagenèse et cancérogénèse, car effectué par des ADN polymérase qui ne possèdent pas d'activité de relecture.

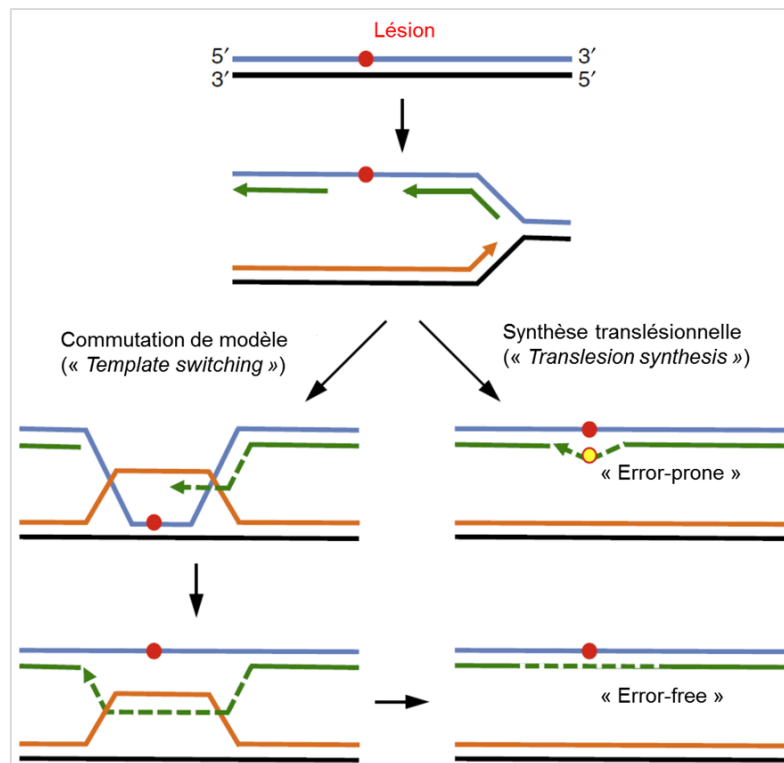


Figure 11 : Représentation schématique des deux principaux modes de tolérance aux dommages. Lorsqu'une lésion est présente sur un des deux brins matriciels de la fourche de réplication (ici le brin retardé), représenté par un point rouge, la cellule active le mécanisme de tolérance aux dommages. Selon le type de lésion, est activé soit le mode sans erreur « commutation de modèle », soit le mode sujet aux erreurs « synthèse translésionnelle ». Réadapté de **Branzei & Psakhye, 2016**.

Les cellules ont donc développé différents mécanismes permettant aux lésions de l'ADN et/ou aux erreurs de réplication d'être « évitées » rapidement et empêcher les effets délétères de l'arrêt d'une fourche de réplication sur une longue période. Le stress de réplication qu'une lésion engendre lorsqu'elle ne peut pas être évitée sera détaillé dans le paragraphe qui suit, ainsi que sa signalisation et les conséquences sur la réplication de l'ADN.

2.1.3. Le stress réplicatif : les causes, sa signalisation et les conséquences

2.1.3.1. Les causes du stress réplicatif

Au cours de la réplication, le réplisome doit faire face à de nombreux obstacles qui représentent un danger pour la copie parfaite du matériel génétique (**Figure 12**). Le ralentissement ou le blocage de la progression de la fourche de réplication et/ou de la synthèse d'ADN qui résultent de ces obstacles est appelé « stress réplicatif » (**Zeman and Cimprich, 2014**). Les sources endogènes du stress réplicatif peuvent être une matrice d'ADN endommagée, des régions difficiles à répliquer telles que des séquences répétitives, une collision avec la machinerie transcriptionnelle, des hybrides ARN-ADN, des adduits protéines-ADN ou encore des structures d'ADN secondaires. L'altération du cycle cellulaire associée à l'activation d'oncogènes et à une prolifération rapide est aussi une source de stress réplicatif,

dû à une insuffisance des pools de dNTP (Ahuja et al., 2016; Neelsen et al., 2013; Zeman and Cimprich, 2014). Les sources exogènes de stress répliatif sont généralement les agents génotoxiques souvent utilisés en radiothérapie tels que les inhibiteurs de topoisomérase (camptothécine, etoposide, doxorubicine), les agents bloquant la synthèse de nucléotides (hydroxyurée et aphidicoline), les agents induisant des crosslink (mitomycine C et cisplatine) et enfin les agents qui endommagent les bases (UV-C, MMS, H₂O₂) (Zellweger et al., 2015). Le challenge est donc de mettre en place des réponses cellulaires spécifiques pour gérer le stress répliatif afin de répliquer correctement l'ADN et assurer la viabilité cellulaire. Ces réponses protègent contre les mutations et la tumorigénèse.

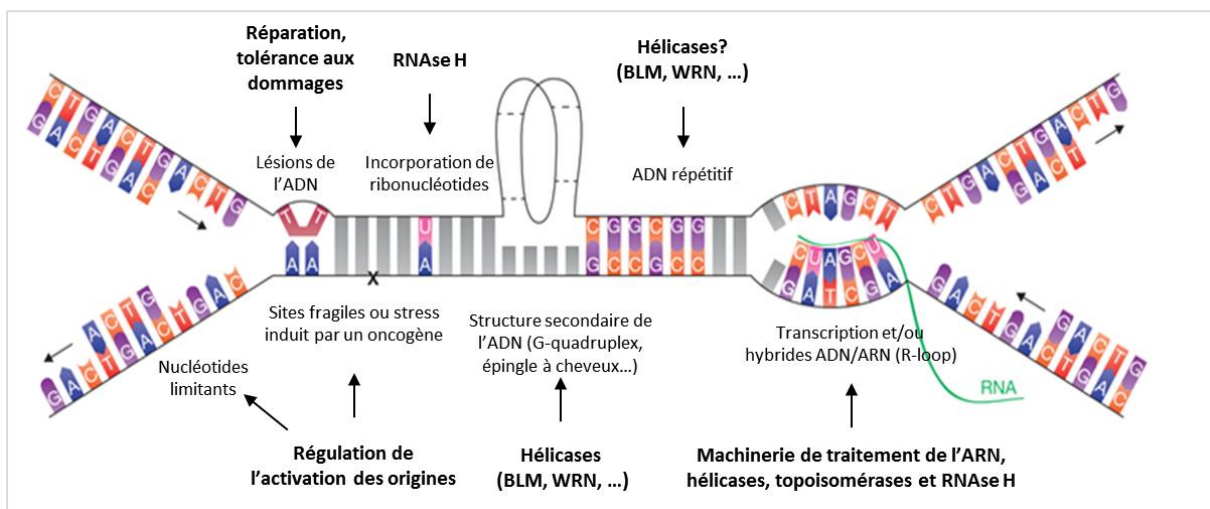


Figure 12 : Les différentes sources du stress répliatif. Il existe de nombreux obstacles qui peuvent ralentir ou bloquer la réplication de l'ADN. Ceci inclut un nombre limité de nucléotides, des lésions d'ADN, l'incorporation de ribonucléotides, des éléments d'ADN répétitifs, des complexes de transcription ou des hybrides ARN-ADN, des structures d'ADN secondaire, des sites fragiles et des stress induits par des oncogènes. Certaines des principales voies de résolution connues pour chaque source de stress sont indiquées en gras. Adapté de Zeman and Cimprich, 2014

2.1.3.2. La signalisation du stress répliatif

Comme vu précédemment, il existe un nombre important d'obstacles rencontrés par le réplisome lors de la réplication de l'ADN. De ce fait, il existe plusieurs mécanismes pour les résoudre de la manière la plus adaptée possible. Lorsque l'ADN est soumis à un stress de réplication, il y a un arrêt de la progression des fourches. Dans de nombreux cas, cet arrêt génère des segments d'ADN simple brin en raison, entre autres, du découplage entre les ADN polymérases et les hélicases. De ce fait, dans les parties traitant du stress répliatif de la suite du manuscrit, seront évoquées principalement les conséquences générées par la formation d'ADN simple brin. C'est aussi probablement le phénomène le plus documenté.

L'ADN simple brin généré à la suite d'un stress répliatif est recouvert par RPA, puis ATR et son partenaire ATRIP sont recrutés (Figure 13). RPA n'est pas suffisant, bien que nécessaire, pour activer ATR (Nam and Cortez, 2011). C'est le recrutement d'autres complexes protéiques tels que RFC^{RAD17} et le complexe 9-1-1 à la jonction simple brin/double brin, suivi du recrutement de TOPBP1, qui vont stimuler l'activité d'ATR (Nam and Cortez, 2011; Saldivar et al., 2017). Il est à noter que l'absence d'ATR après un stress de réplication conduit à la formation d'un simple brin d'ADN très long qui peut résulter en un épuisement de RPA et en une cassure de l'ADN (Saldivar et al., 2017). D'autre part, RPA interagit avec une autre protéine nommée ETAA1 qui permet l'activation d'ATR indépendamment de RAD17 et 9-1-1 (Bass et al., 2016; Feng et al., 2016). Une fois activée, ATR orchestre la stabilisation, la réparation ou le redémarrage des fourches avec Chk1 (phosphorylée par ATR). Ici, l'activation de Chk1 permet également d'inhiber l'activation des origines de réplication (Saldivar et al., 2017). Le choix de la voie de redémarrage des fourches dépend de la nature et de la localisation de la lésion de l'ADN. Parallèlement, TOPBP1 et ETAA1 phosphorylent d'autres cibles telles que l'histone H2AX devenant γ H2AX, permettant le recrutement de RAD51 (sa fonction dans la protection des fourches bloquées et de redémarrage des fourches sera expliquée plus loin dans le manuscrit).

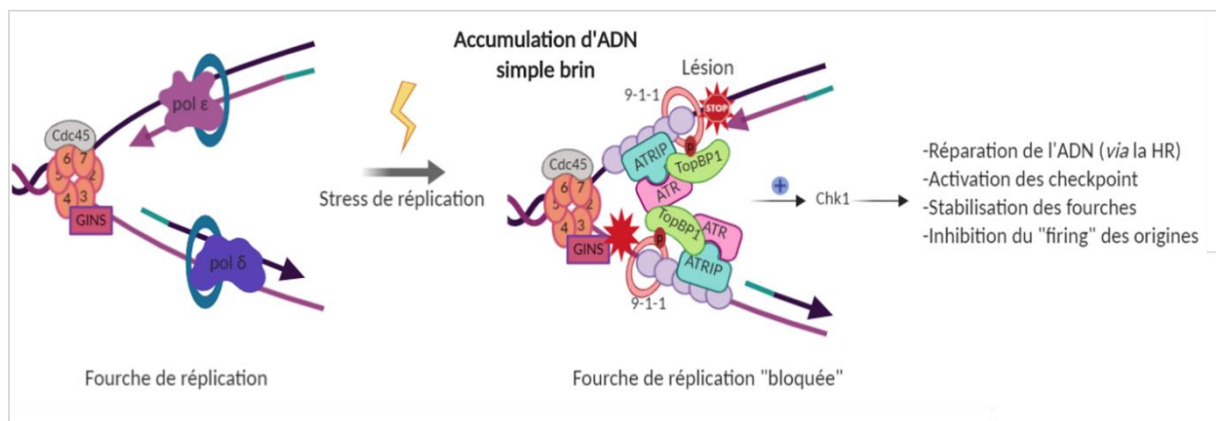


Figure 13 : Les principaux acteurs de la signalisation du stress répliatif et ses conséquences sur la réplication de l'ADN.

2.1.3.3. Les conséquences du stress répliatif sur la fourche de réplication

A la suite d'un stress répliatif, deux types de fourches de réplication peuvent être observées : les fourches en pause, bloquées ou « *stalled fork* » et les fourches dysfonctionnelles ou « *collapsed fork* ». Une fourche en pause se transforme la plupart du temps en fourche inversée ou « *reversed fork* » pour reprendre la réplication une fois la lésion passée car l'intégrité du réplisome est maintenue, alors que la fourche dysfonctionnelle ne peut pas revenir à son état de base. Dans ce dernier cas, on dit qu'elle s'effondre car les protéines du réplisome sont dissociées et qu'une DSB s'est créée. Lorsqu'une fourche bloquée persiste, par exemple lorsque des cellules sont traitées à l'hydroxyurée de manière

prolongée, elle est convertie en fourche dysfonctionnelle et nécessite d'être réparée avant de pouvoir redémarrer (Cortez, 2015; Petermann et al., 2010). Souvent, la réparation des fourches se fait avec l'aide d'acteurs de la recombinaison homologue. Cet aspect d'assistance de la RH pour la résolution des lésions sera discuté plus loin, dans la partie 2.3. Il est à noter que lorsque les conditions requises pour redémarrer une fourche de réplication bloquée sont de nouveau réunies (par exemple un pool de dNTP revenu à la normale), elle peut reprendre sa course « telle quelle », sans intervention des acteurs de la recombinaison homologue.

2.2. La réparation des dommages de l'ADN

Les mécanismes de réparation de l'ADN mis en place par les cellules vont dépendre des caractéristiques et de la complexité des dommages subis par l'ADN. Ces mécanismes de réparation ont été hautement conservés au cours de l'évolution. Les principaux sont la réparation des mésappariements (« *Mismatch repair* » ou MMR), la réparation par excision de base (« *Base Excision Repair* » ou BER) ou de nucléotides (« *Nucleotide Excision Repair* » ou NER) et la réparation des cassures double-brin où l'on distingue deux mécanismes principaux : la jonction d'extrémités non homologues (« *Non Homologous End Joining* » ou NHEJ) et la recombinaison homologue (« *Homologous Recombination* » ou HR) (Figure 14). Ces mécanismes sont distincts de par leurs protéines impliquées, bien que le NER, le BER et le MMR utilisent des étapes moléculaires présentant des similitudes.

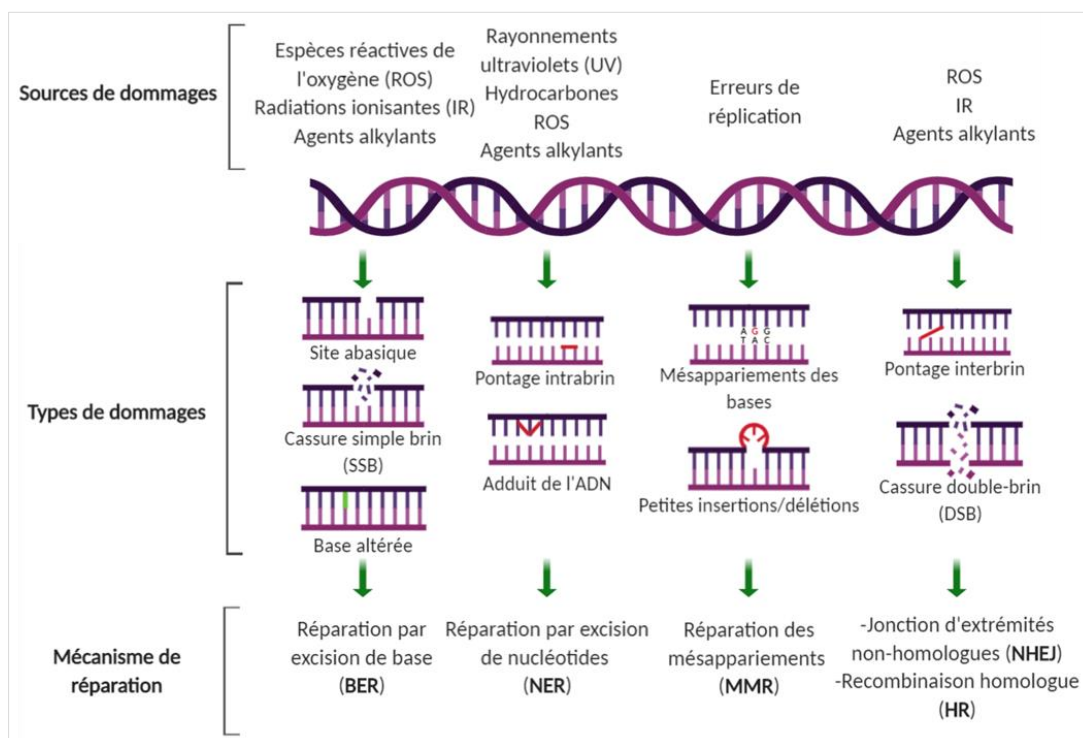


Figure 14 : Les principaux types de lésions à l'ADN, les types de dommages qu'ils engendrent et leur voie de réparation.

2.2.1. La réparation des cassures simple-brin de l'ADN

Les lésions qui n'affectent qu'un seul brin de la double hélice de l'ADN sont prises en charge par les trois voies principales décrites ci-après (**Figure 15**).

2.2.1.1. La réparation par excision de bases (BER)

Le BER est impliqué dans la suppression et le remplacement de bases endommagées de l'ADN. C'est le système de réparation des dommages de l'ADN le plus simple qu'il soit. Il se compose de trois phases successives qui sont la suppression de la ou des base(s) modifiée(s), l'excision de la zone autour du site abasique et la resynthèse de l'ADN par une ADN polymérase. Ainsi, les dépurinations, les alkylations et les réactions d'oxydation de l'ADN seront réparées par le BER. Brièvement, une glycosylase reconnaît et excise la base endommagée au niveau de la liaison glycosidique entre le désoxyribose et la base. Il y a ainsi formation d'un site abasique qui est clivé par une endonucléase (APE1 chez l'Homme). La cassure simple brin est reconnue par PARP1 qui permet l'accumulation de XRCC1 pour protéger le simple brin généré. Enfin l'ADN polymérase β ajoute les bases complémentaires au simple brin et une ligase scelle le tout (**Figure 15**) (E.Krokan and Bjørn, 2013).

2.2.1.2. La réparation par excision de nucléotides (NER)

Cette voie de réparation est utilisée pour réparer des dommages plus étendus entraînant des torsions de l'ADN. Elle contrôle la suppression des adduits d'ADN et la réparation des crosslink intrabrin. Par exemple, les dimères de pyrimidine induits par les UV sont réparés par le NER. Cette voie conduit au retrait d'un oligonucléotide de 25-30 bases contenant l'adduit, résultant d'un ADN simple brin utilisé comme matrice par les ADN polymérases avant la ligation. Il existe deux modes de réparation : le TCR (« *transcription coupled-NER* ») et le GGR (« *global genomic-NER* »). Le TCR est dépendant de la transcription tandis que le GGR est dit global, il supprime les lésions de l'ensemble du génome. Ils diffèrent uniquement dans leur mode de reconnaissance de la lésion. Le TCR est initié lorsque l'ARN polymérase II rencontre une lésion au niveau de l'ADN matrice, induisant le recrutement de protéines CSA et CSB. Le GGR quant à lui, est initié par la reconnaissance de distorsions de l'ADN par la protéine XP-Rad23. A la suite de l'une ou l'autre de ces étapes, les hélicases XPB et XPD, contenus dans le facteur de transcription TFIIH, déroulent l'ADN pour séparer les deux brins. RPA et XPA sont recrutés pour stabiliser ce complexe et vont recruter les endonucléases XPG et XPF-ERCC1. Ces dernières vont inciser la lésion pour exciser l'oligonucléotide endommagé. Enfin, l'ADN est resynthétisé par les polymérases ϵ/δ et lié par des ligases I / III (**Figure 15**) (Petruseva et al., 2014; Scha, 2013).

2.2.1.3. La réparation des mésappariements (MMR)

La réparation des mésappariements (MMR) est un mécanisme responsable de la correction du mésappariement des bases qui survient lorsque adénosine-guanine et cytosine-thymidine ne sont pas correctement appariées (**Modrich, 1991**). Le MMR corrige également les insertions et les délétions résultant d'une répliation erronée par une ADN polymérase. Le MMR se déroule en trois étapes successives : la reconnaissance du mésappariement, l'excision de la séquence d'ADN incorrecte puis la resynthèse d'une séquence d'ADN correcte. Dans un premier temps, la lésion est détectée par le complexe hMutS (2 hétérodimères). L'hétérodimère MSH2-MSH6 reconnaît les mésappariements et les courtes insertions (<10 pb) tandis que l'hétérodimère MSH2-MSH3 reconnaît les insertions/délétions (>10 pb). L'hétérodimère hMutL (MLH1-PMS2) est alors recruté à son tour pour exciser le brin défectueux ce qui fournit un point d'encrage pour l'exonucléase Exo1. Exo1 dégrade le brin non apparié ce qui est suivi du recrutement rapide de RPA pour protéger le simple-brin d'ADN généré par Exo1. Enfin, dans l'étape de resynthèse, l'ADN polymérase synthétise un nouveau brin d'ADN complémentaire pour corriger le mésappariement et l'ADN ligase 1 comble le trou et restaure la double hélice d'ADN (**Figure 15**) (**Fleck and Nielsen, 2004; Helena et al., 2018; Li, 2008**).

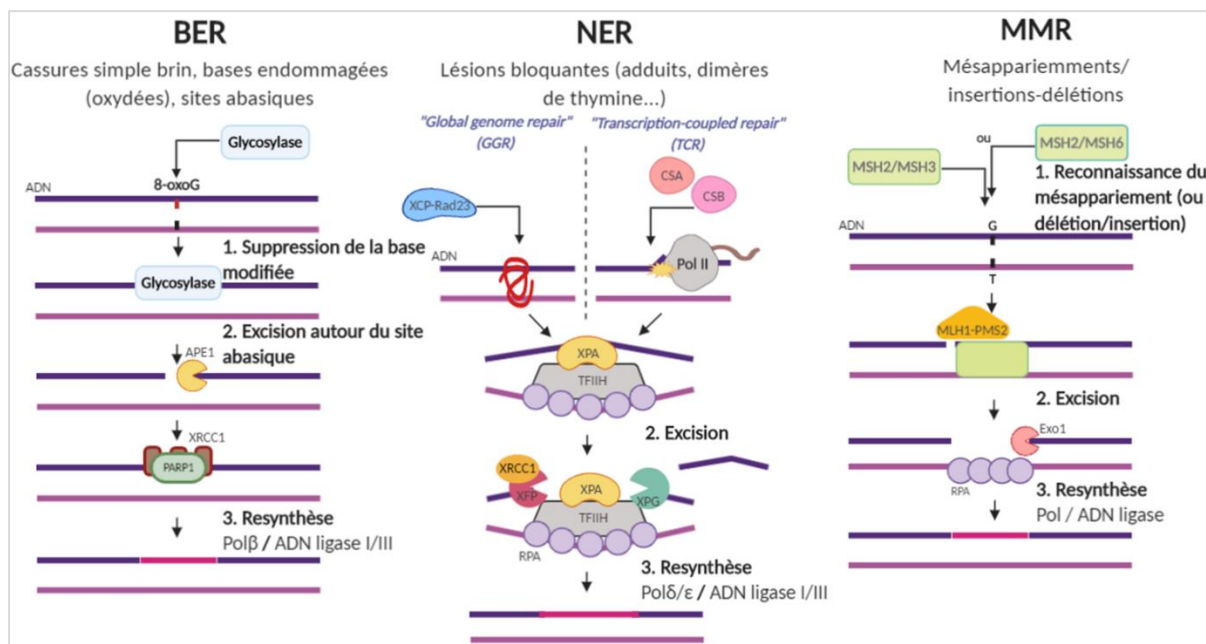


Figure 15 : Schéma représentatif des principales voies de réparation des cassures simple-brin de l'ADN.

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

Les cassures double-brin (DSB) de l'ADN sont des lésions létales majeures pour les cellules. Plus difficiles à réparer que les cassures simple brin, elles peuvent engendrer des translocations chromosomiques et être à l'origine de cancers. Les mécanismes pour les réparer sont : la recombinaison

homologue (« *Homologous Recombination* » ou HR), la réparation par la jonction d'extrémités non-homologues classique (« *classical Non-Homologous End-Joining* » ou c-NHEJ) et la réparation par la jonction d'extrémité non-homologues alternative (« *alternative non-homologous end-joining* » ou Alt-NHEJ). Chacune de ces voies requière des facteurs de réparation spécifiques et les produits de réparation sont différents. Les deux principales voies de réparation des DSB largement décrites dans la littérature à ce jour sont la c-NHEJ (qu'on appellera par la suite NHEJ pour simplifier) et la HR. Ces voies de réparations ainsi que leurs principaux acteurs seront décrits de manière simplifiée par la suite.

Le suivi de cellules vivantes par imagerie indique que l'activité maximale de la HR se trouve en milieu de phase S alors que l'activité maximale de la NHEJ prédomine en phase G1 et G2 (**Karanam et al., 2012**). La NHEJ est réprimée pendant la méiose par un mécanisme impliquant la phosphorylation de facteurs de réponse aux dommages de l'ADN par CDK1 (**Orthwein et al., 2014**).

2.2.2.1. La réparation des cassures double-brin via la NHEJ

La NHEJ est une voie de réparation directe des DSB, c'est-à-dire qu'elle n'a pas besoin de la présence de la chromatide sœur comme modèle pour la réparation ce qui en fait un mécanisme rapide. A titre d'illustration, l'intégration de rapporteurs fluorescents au sein de chromosomes humains révèlent que la NHEJ a une durée approximative de 30 minutes contre plus de 7h pour la HR et couvre environ 75% des réparations (**Mao et al., 2008**). Cependant, ce mécanisme de réparation rapide n'est pas très fiable car il est souvent accompagné de courtes délétions et/ou de changements de bases ; ce qui le qualifie de « *error-prone* » c'est-à-dire sujet aux erreurs. (**Chang et al., 2017**).

Les trois étapes de la NHEJ sont (i) la détection des extrémités cassées de l'ADN et (ii) leur maturation pour les rendre compatibles à (iii) leur ligation.

L'étape initiale de la NHEJ est la reconnaissance puis la fixation rapide de l'hétérodimère Ku70/80 aux DSB (**Figure 16**, B, étape 1). Les séquences de ces deux protéines sont assez divergentes alors que leurs domaines fonctionnels et leurs structures sont très conservés. Leurs parties N-terminale, qui contient le domaine von Willebrand (vWA) et le domaine Ku central, sont responsables de l'hétérodimérisation des deux protéines alors que la partie C-terminale contient le domaine de liaison à l'ADN (domaine SAP) (**Doherty and Jackson, 2001; Zhang et al., 2001**). Ku est la première protéine à fixer l'ADN du fait de son abondance, estimée à environ 400 000 molécules par cellule et de son Kd (constante de dissociation) élevé qui est de l'ordre de 10^{-9} M pour les extrémités d'ADN double-brin (**Blier et al., 1993; Falzon et al., 1993; Mimori and Hardin, 1986**). Lorsque Ku70/80 se lie à une extrémité double-brin d'ADN (formant un complexe Ku : ADN), il change de conformation. Ainsi, grâce à sa forme toroïdale lui conférant un rôle de « ceinture à outil » (« *toolbelt* »), il est capable d'interagir avec les différentes enzymes impliquées dans la NHEJ (nucléase, polymérase et ligase) (**Figure 16**, A). Il est à

noter que chacune de ces enzymes possède une flexibilité dans leur fonction qui peut induire différents types de produits en fin de NHEJ. C'est cette variabilité de résultats qui la qualifie de « error-prone » (Lieber, 2008).

A la suite d'un dommage, la plupart du temps, les extrémités de chaque brin d'ADN « cassé » sont incompatibles (en raison de modifications chimiques par exemple), empêchant leur ligature directe (Figure 16, C). Une extrémité 5' phosphate et une autre 3' hydroxyle est un prérequis pour la ligature de ces dernières. Par exemple, l'action de la polynucléotide kinase/phosphatase PNKP permet de garantir ce résultat (Bernstein et al., 2005). Lors d'une lésion complexe, afin de garantir la compatibilité des deux extrémités, quelques nucléotides (débordants) nécessitent d'être ôtés par l'endonucléase Artemis. Dans la NHEJ, la serine thréonine kinase DNA-PKcs, formant un complexe avec Artemis (complexe DNA-PKcs : Artemis), est recrutée par le complexe Ku : ADN. Artemis est alors activée par DNA-PKcs à la suite de son autophosphorylation (Gu et al., 2010), lui permettant ainsi de couper de nombreux substrats d'ADN (acquisition de son activité 3' et 5' endonucléase). Une brèche est alors formée dans chaque brin d'ADN (Figure 16, B, étape 2) (Chang and Lieber, 2016; Chang et al., 2015). Il est à noter que parfois, la NHEJ fait appel au complexe MRN pour maintenir les extrémités cassées physiquement proches et faciliter leur jointure, mais indépendamment de son activité de résection, comme dans la RH (Xie et al., 2009). Cependant, il a été montré récemment qu'une résection pouvait avoir lieu même en phase G1 dans le cadre d'une réparation de DSB mais que cette réparation est plus lente et sujette aux mutations (Biehs et al., 2017).

Le complexe Ku : ADN recrute également les ADN polymérases lambda (pol λ) et mu (pol μ), *via* leur domaine BRCT, pour combler les brèches (Figure 16, B, étape 3). Ces polymérases appartiennent à la famille des ADN polymérase pol X, elles sont recrutées pour prévenir la perte d'information génétique en synthétisant localement plusieurs bases. Cependant, elles peuvent incorporer des nucléotides de façon matrice-indépendante rendant la synthèse infidèle la plupart du temps (Mcelhinny et al., 2005). Enfin, le recrutement du complexe XLF : XRCC4 : DNA ligase IV par Ku : ADN permet la ligature des deux extrémités d'ADN (Figure 16, B, étape 4). XRCC4 stabilise l'ADN ligase IV et améliore son activité tandis que XLF stimule la capacité du complexe XRCC4 : ADN ligase IV à lier les extrémités d'ADN en présence de cations Mg^{2+} . Cependant, le complexe est capable de lier à travers les brèches et de lier des extrémités d'ADN incompatibles, ce qui provoque des erreurs dans la séquence de l'ADN (Figure 16, B étape 2) (Gu et al., 2007b, 2007a).

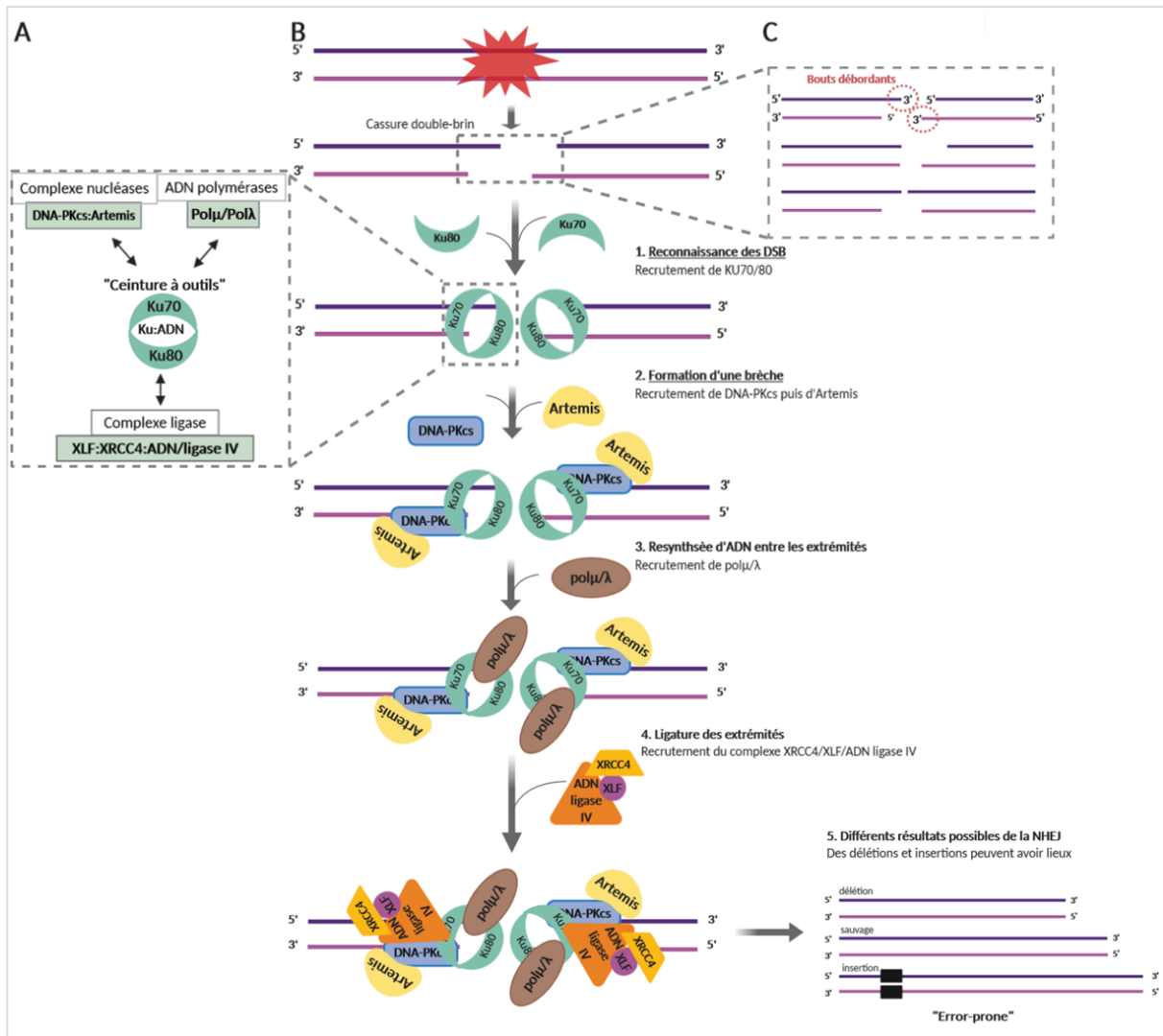


Figure 16 : Les principales étapes de la NHEJ et les principaux partenaires protéiques impliqués.

Dans un contexte physiologique lié au vieillissement, il a été montré que l'expression des protéines XRCC4 et DNA ligase IV diminue avec l'âge et donc que la fidélité et l'efficacité de la NHEJ déclinent, augmentant le risque d'instabilité génétique (Li et al., 2016). De plus, des pathologies peuvent être dues à des mutations dans les gènes codants des protéines centrales de la NHEJ. Par exemple, deux pathologies, les LIG4 syndrome et Art-SCID syndrome, dues à des mutations dans le gène LIG4 (codant pour la DNA ligase 4) et DCLRE1C (codant pour Artemis) respectivement, présentent des défauts prononcés dans la réparation des cassures double-brin par la NHEJ (Driscoll and Jeggo, 2006). Egalement, les patients présentant des mutations dans le gène PRKDC codant pour la protéine DNA-PKcs présentent une sévère immunodéficience et les cellules isolées de ces patients présentent un défaut d'assemblage des extrémités d'ADN (Sishc and Davis, 2017). De même, la mutation de l'E3 ubiquitine ligase RNF168 ne permet plus le recrutement correct de 53BP1 aux cassures double-brin et induit une hypersensibilité aux radiations ionisantes, des anomalies des points de contrôle du cycle

cellulaire ainsi qu'une altération de la jonction des extrémités d'ADN. C'est le cas des patients atteints du syndrome de RIDDLE (« *radiosensitivity, immunodeficiency, dysmorphic features and learning difficulties* ») (Stewart, 2009). Enfin, certains cancers montrent des expressions différentielles des facteurs de la NHEJ sans mutations dans leurs gènes. Par exemple, l'expression des protéines Ku70 et Ku80 peut être diminuée conduisant à une instabilité du génome. C'est le cas pour certains cancers de l'endomètre et la macroglobulinémie de Waldenström (Sisic and Davis, 2017). Au contraire, l'expression de protéines de la NHEJ peut être augmentée conduisant également à une instabilité et à la carcinogénèse. C'est le cas par exemple dans les leucémies myéloïdes ou dans les cancers colorectaux où Ku est surexprimé (Sisic and Davis, 2017).

Ainsi, même si la NHEJ n'est pas le mécanisme le plus fidèle de réparation de l'ADN, elle paraît être importante dans le maintien de la stabilité du génome car en cas de régulation altérée de la voie, ceci conduit à la carcinogénèse.

Lorsque la NHEJ classique (c-NHEJ) ne peut pas être mise en place (par exemple lorsqu'une ou plusieurs protéines de la voie est déficiente), la alt-NHEJ est alors utilisée comme voie de secours. C'est une voie secondaire qui met en jeu les protéines PARP1 (pour la reconnaissance des extrémités cassées), MRE11 et CtIP (pour la résection des extrémités), et les ligases I / III et possiblement XRRC1 (pour la ligation des extrémités) (Audebert et al., 2004; Mansour et al., 2010; Rass et al., 2009; Soni et al., 2014). Bien que longtemps considérée comme voie de secours uniquement, la alt-NHEJ apparaît de plus en plus comme étant une voie de réparation importante à part entière. Cependant cette voie est beaucoup moins fidèle que la c-NHEJ et se retrouve impliquée dans l'origine de translocations chromosomiques et de cancers (Dueva and Iliakis, 2013; Iliakis et al., 2015; Yan et al., 2007).

2.2.2.2. La réparation des cassures double-brin via la HR

Contrairement à la NHEJ, la HR est restreinte aux phases S et G2 du cycle cellulaire car ce mécanisme nécessite la disponibilité d'une matrice d'ADN intacte, c'est-à-dire d'une copie homologe de la région contenant le DSB, à savoir la chromatide sœur. La HR peut être initiée après des dommages induits par des agents génotoxiques, par exemple pour réparer les DSB, lorsqu'une fourche de réplication rencontre une DSB pour assurer la progression de la réplication de l'ADN et également lors de la méiose pour promouvoir la diversité génétique. Ainsi, cette partie va être consacrée à la description des mécanismes généraux de la HR impliqués dans la réparation des DSB. Plus loin, dans la partie 2.4, seront décrits les mécanismes de la HR couplés à la réplication de l'ADN.

Après reconnaissance d'une DSB par le complexe MRN (constitué des protéines MRE11/RAD50/NBS1), l'étape initiale de la HR est la résection des DSB (Figure 17, étape 1). Celle-ci se

fait sur un brin, de part et d'autre de la DSB, dans le sens 5' vers 3' et génère un ADN simple brin en position 3' (Daley et al., 2015). Ceci est rendu possible grâce à la protéine MRE11 qui possède une activité endonucléase et 3'-5' exonucléase. Une fois recrutée à l'ADN et dimérisée, MRE11 va inciser l'ADN en amont du DSB *via* son activité endonucléase puis digérer l'ADN en direction de l'extrémité *via* son activité 3'-5' exonucléase (Coates et al., 2016; Paull and Gellert, 1998). MRE11 lie la protéine RAD50, qui lie elle-même l'ADN. Cette interaction va permettre de maintenir l'ADN pris en charge par MRN à la DSB grâce à sa capacité à se dimériser avec une autre RAD50 présente sur l'autre extrémité de la DSB (Jager et al., 2001). MRE11 lie NBS1 *via* son domaine C-terminal, cette interaction est nécessaire au recrutement de la kinase ATM (Paull and Lee, 2005). Le domaine N-terminal de NBS1 permet de reconnaître la forme phosphorylée de la protéine CtIP (Lloyd et al., 2009; Williams et al., 2009). Cette protéine permet d'activer l'activité endonucléase de MRE11 et d'initier la résection. Le complexe MRN et la protéine CtIP sont responsables de la résection sur quelques centaines de bases. Pour que la résection soit plus étendue, le système nécessite d'autres enzymes telles que l'exonucléase EXO1 (activité 5'-3') et l'hélicase BLM qui en coopération avec une autre endonucléase DNA2 vont permettre l'extension de la résection (Daley and Sung, 2014). Une fois l'ADN simple brin formé, il est immédiatement lié et stabilisé par l'hétérotrimère RPA (composé de RPA14, RPA32 et RPA70) *via* son domaine OB-fold (Figure 17, étape 2) (Bochkarev et al., 1999).

L'hétérotrimère RPA est ensuite remplacé progressivement par l'ATPase RAD51. Cet échange protéine-protéine est facilité par des médiateurs de la recombinaison tels que BRCA2 (Figure 17, étape 3). Cette grande protéine stabilise RPA grâce à ses nombreuses copies du motif BRC dans sa partie C-terminale et favorise la nucléation de RAD51 au niveau de l'ADN simple-brin spécifiquement (Carreira et al., 2009; Filippo et al., 2006). Après qu'un cluster de RAD51 soit chargé sur l'ADN simple-brin, il va servir de « noyau » pour l'assemblage du filament RAD51, ou filament présynaptique, en partie grâce aux partenaires protéiques de BRCA2, à savoir BRCA1 et PALB2 (Sy et al., 2009; Zhang et al., 2009). Une fois le filament RAD51 formé, la recherche d'homologie, c'est-à-dire la recherche d'une séquence homologue à travers le génome, peut avoir lieu.

La recherche d'homologie est un mécanisme très complexe qui est détaillé, entre autres, dans la revue (Renkawitz, 2014). Cette étape est influencée par la phase du cycle cellulaire qui détermine la présence de la chromatide sœur intacte (Figure 17, étape 4). L'ensemble simple-brin d'ADN-filament RAD51 est étiré afin que la recherche d'homologie soit rapide et efficace. Une fois l'homologue trouvée, RAD51 facilite la formation d'une connexion physique entre le brin envahissant et l'ADN homologue conduisant à la formation d'une structure transitoire à 3 brins nommée la « D-loop » (Figure 17, étape 5). L'extrémité 3'OH du brin envahissant au sein de la D-loop va servir d'amorce pour la synthèse du brin complémentaire 5', par la machinerie répliquative. Deux scénarios sont alors possibles. Le premier scénario est la réparation par conversion génique, c'est-à-dire que la D-loop étendue est capturée par

la seconde extrémité de la DSB pour conduire à la formation d'une double jonction de Holliday. Ces jonctions peuvent ensuite être résolues et le produit de formation contiendra ou non des crossing-over (**Figure 17**, étape 6, gauche). Cette voie est essentielle lors de la méiose pour promouvoir la diversité génétique (**Heyer, 2004; Szostak et al., 1983**). Le deuxième scénario est la dissolution des jonctions de Holliday. Ici, le brin étendu est libéré de la D-loop, inhibant la formation de la deuxième jonction de Holliday, et s'hybride directement avec la deuxième extrémité de la DSB, ce qui ne produit pas de crossing-over (**Figure 17**, étape 6, droite) (**Heyer, 2004**).

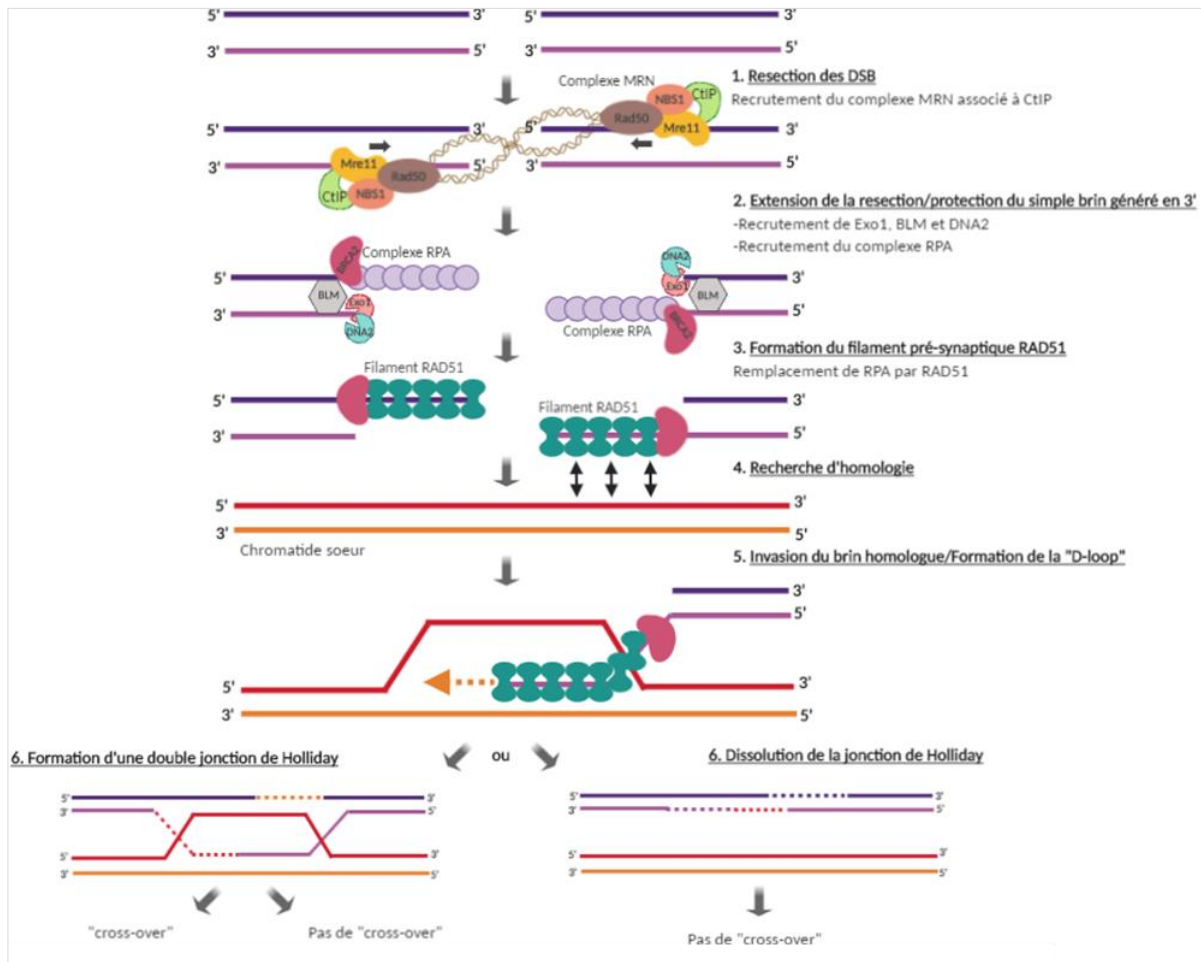


Figure 17 : Les principales étapes de la HR et les principaux partenaires protéiques impliqués.

Finalement, la RH est essentielle pour réparer les DSB au cours de la phase S et G2 du cycle cellulaire mais également pour promouvoir la diversité génétique au cours de la méiose.

De nombreuses maladies et cancers sont associés à un défaut de réparation de l'ADN par la HR. Ce mécanisme est d'autant plus important qu'il se produit pendant la phase S du cycle cellulaire et qu'il permet la transmission fidèle de l'information génétique dans les lignées germinales au cours de la méiose. Une des pathologies bien connue qui implique un défaut de la HR est l'anémie de Fanconi (« *fanconi anemia* » ou FA). C'est une pathologie génétique rare qui fait partie des plus fréquents

syndromes d'insuffisance médullaire. La maladie se déclare à l'enfance avec une insuffisance médullaire puis à l'adolescence se développe la leucémie myéloïde (Tischkowitz and Hodgson, 2003). Le risque de développer des tumeurs solides chez l'adulte est très élevé. Du point de vue moléculaire est observé un défaut de RAD51, PALB2 (qui interagit avec BRCA2) et SLX4 (qui résout les jonctions de Holliday) (Kim et al., 2011; Reid et al., 2007; Xia et al., 2007). Ce sont les mutations des gènes de Fanconi qui sont principalement responsables de la maladie. Il existe au moins 15 protéines FA. La plupart de ces protéines forment le complexe FANC qui est responsable de la dissolution des pontages interbrin (« *interstrand crosslink* » ou ICL) après dommages de l'ADN pour permettre aux fourches de réplication de progresser correctement (Lopez-Martinez et al., 2016; Wang and Gautier, 2010). Enfin, la mutation des gènes BRCA1 et/ou BRCA2 prédispose un individu à la malignité. En effet, les patients porteurs de mutations BRCA1 et BRCA2 présentent un risque très élevé de développer un cancer du sein et de l'ovaire, atteignant respectivement 84% et 39% (Mersch et al., 2015).

En plus des mécanismes de réparation, les DSB activent des voies de signalisation entraînant une série de réponses cellulaires telles que l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore des changements transcriptionnels.

2.3. La signalisation des cassures double-brin de l'ADN et le choix des voies de réparation

2.3.1. La signalisation des cassures double-brin de l'ADN

En réponse aux dommages de l'ADN se produisant durant la phase G1 ou G2, les points de contrôle de ces dommages ou « *DNA damage checkpoint* » bloquent la progression du cycle cellulaire, laissant le temps à la cellule pour réparer les dommages avant de passer à la phase suivante (Rhind and Russell, 2012; Shaltiel et al., 2015). La réponse aux dommages de l'ADN pendant la phase S doit être coordonnée avec la réplication de l'ADN (Bartek et al., 2004). Selon la nature du dommage, la signalisation sera différente.

La protéine ATM est au cœur de la signalisation en réponse aux DSB bien que dans certaines circonstances, la protéine ATR peut aussi déclencher une cascade de signalisation. Le senseur initial des DSB est le complexe MRN qui est constitué des protéines MRE11/RAD50/NBS1. La connexion entre ATM et les DSB se produit suite à l'interaction entre la protéine NBS1 du complexe MRN et ATM (Falck et al., 2005; Lee and Paull, 2005). ATM phosphoryle ensuite la sérine 139 du variant d'histone H2AX, générant γ H2AX (Chen et al., 2001). Cette marque d'histone peut s'étendre sur plusieurs kilobases de part et d'autre de la cassure et initier l'assemblage de protéines du DDR qui vont à leur tour initier d'autres modifications d'histones au voisinage de la DSB et influencer l'assemblage de protéines en aval de la

DBS (Panier, 2013; Panier and Boulton, 2014). γ H2AX facilite le recrutement de la protéine MDC1, également phosphorylée par ATM après un dommage. MDC1, une protéine centrale dans le recrutement de nombreuses protéines du DDR (Coster and Goldberg, 2010), interagit également constitutivement avec NBS1, renforçant ainsi l'action d'ATM aux DSB. Ces événements constituent une boucle de rétrocontrôle positive (« *MRN-ATM-MDC1 feedback loop* ») qui conduit à l'amplification du signal γ H2AX (Figure 18, a).

MDC1 recrute ensuite l'ubiquitine ligase RNF8 et l'enzyme E2 UBC13 (Yan and Jetten, 2008). L'action conjuguée de ces deux protéines induit la poly-ubiquitinylation de l'histone H1, ce qui permet le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase RNF168 qui va ensuite ubiquitinyler les lysines 13 et 15 de H2A (Figure 18, b) (Mattioli et al., 2012).

La formation de γ H2AX et le recrutement de MDC1 associé à ses partenaires protéiques sont les événements les plus rapides à se produire après l'induction de DSB, c'est-à-dire de quelques secondes à quelques minutes. Après un délai d'environ 1 à 2 minutes, apparaît une seconde vague de recrutement de protéines aux DSB, incluant les protéines 53BP1 et BRCA1 (Mailand et al., 2007). D'une part, 53BP1 reconnaît la diméthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me2) *via* son double domaine Tudor. 53BP1 reconnaît également l'ubiquitinylation de la lysine 15 de l'histone H2A (H2A-K15ub) *via* son domaine UDR localisé à proximité du double domaine Tudor (Figure 18, c) (Botuyan et al., 2006; Panier and Boulton, 2014; Zimmermann and De Lange, 2014). 53BP1 interagit également avec MRN ce qui permet d'augmenter les quantités d'ATM recrutées aux DSB et de renforcer son action. En fait, une fois recrutée aux DSB, 53BP1 agit en tant que plateforme protéique chargée de recruter d'autres facteurs de réparation en aval des DSB. Il n'affecte ni le traitement initial des extrémités de l'ADN par Ku, ni la phosphorylation de H2AX par ATM, ni le recrutement de MDC1 par γ H2AX (Gupta et al., 2013). D'ailleurs l'association de 53BP1 aux DSB en G1 promeut la NHEJ. D'autre part, l'ubiquitinylation de H2A par RNF168 et UBC13 permet le recrutement de la protéine RAP80, ce qui facilite le recrutement du complexe BRCA1-A aux sites de dommages de l'ADN (Figure 18, c). Ce complexe contenant les protéines RAP80, BRCA1, BARD1, ABRAXAS, BRCC36 permet de limiter la résection excessives des extrémités par exemple (Wang and Elledge, 2007). BRCA1 exerce ses fonctions à travers la participation de 3 autres complexes (BRCA1-B, C, D). A eux quatre, ces complexes ont un rôle important dans la résection des extrémités, que ce soit pour l'initier, l'étendre ou la limiter (Savage and Harkin, 2015).

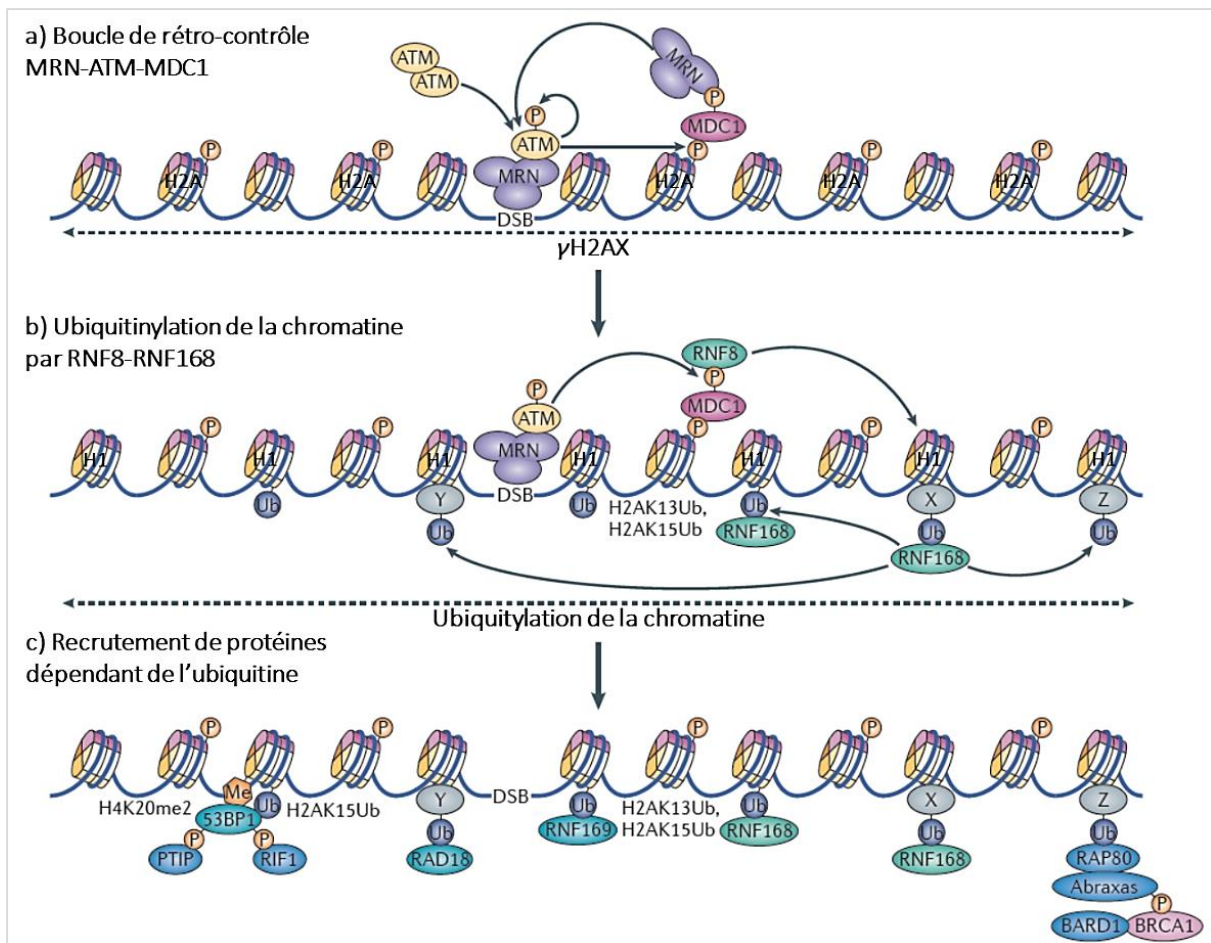


Figure 18 : La voie de transduction du signal ATM associée à la chromatine. Réadapté de Panier, 2013.

Il est donc clairement établi que les protéines 53BP1 et BRCA1 sont recrutées aux DSB selon une voie de signalisation commune dépendante d'ATM et des ubiquitines ligases RNF8 et RNF168. Cependant ces deux protéines ont des rôles antagonistes quant à la régulation de la réparation des cassures. Ainsi, le « choix » de la voie de réparation sera discuté dans le paragraphe qui suit.

2.3.2. Le choix des voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN

Comme vu précédemment, les cellules possèdent deux mécanismes principaux pour réparer les DSB, la NHEJ et la HR. La caractéristique déterminante de ces deux voies est la régulation différentielle de la résection des extrémités d'ADN au cours du cycle cellulaire.

Parmi les régulateurs de la résection des extrémités, BRCA1 et 53BP1 en sont les principaux acteurs. BRCA1 promeut la HR en activant la résection de l'ADN en phase S, tandis que 53BP1 forme une barrière qui empêche la résection excessive des extrémités d'ADN en phase G1 (Panier & Boulton, 2014; J. M. Daley & Sung, 2014). Il existe par ailleurs une relation antagoniste entre 53BP1 et BRCA1 (Bouwman et al., 2010; Bunting et al., 2010). En effet, par exemple, il a été montré que chez des souris délétées de l'exon 11 du gène BRCA1, la létalité embryonnaire, la prédisposition au cancer (pour les

porteurs de mutations de BRCA1) et la déficience de BRCA1 des cellules sont restaurées après déplétion de 53BP1 (**Bouwman et al., 2010; Bunting et al., 2010**). Ces phénotypes sont dus au fait que lorsque BRCA1 est absent et 53BP1 présent, la résection n'est pas régulée positivement en phase S et une NHEJ inappropriée se poursuit au niveau des DSB entraînant des réarrangements chromosomiques.

La NHEJ est la voie privilégiée pour la réparation des DSB. En effet, quelle que soit la phase du cycle cellulaire, 53BP1 peut être phosphorylée par ATM suite à un dommage. Ceci permet le recrutement de RIF1 et l'inhibition de la résection (**Chapman et al., 2013**). Il existe un moyen pour les cellules d'inhiber la NHEJ pour promouvoir la HR. Par exemple, en phase S/G2, après phosphorylation de 53BP1 par ATM et recrutement transitoire de RIF1, 53BP1 est rapidement déphosphorylée par la phosphatase PP4C grâce à son interaction avec BRCA1 pour permettre le relâchement de RIF1 et donc la résection des extrémités (**Isono et al., 2017**). L'interaction de BRCA1 avec CtIP (possible grâce à sa phosphorylation par CDK1) permet également d'inhiber l'accumulation de RIF1 en phase S/G2 (**Escribano-Díaz et al., 2013**). Récemment, il a été montré que RIF1 interagit avec le complexe shieldin (composé de 4 protéines REV7, RINN1, RINN2, RINN3) pour promouvoir la NHEJ. Ces protéines sont requises pour la restriction de la résection des extrémités ce qui pourrait expliquer que leur déplétion diminue la NHEJ à la suite d'un dommage. La déplétion de REV7 induit également une résistance des cellules déficientes pour BRCA1 aux inhibiteurs de PARP (**Gupta et al., 2018**). Ainsi le complexe shieldin protégerait les DSB de la résection et fonctionnerait comme un effecteur de 53BP1 dans le choix de la voie de réparation. La phosphorylation de 53BP1 par ATM après un dommage induit également le recrutement de PTIP, une protéine recrutée aux DSB en aval de RNF8 et RNF168, qui comme 53BP1 et RIF1, bloque la résection des extrémités en G1 (**Panier and Boulton, 2014**). En aval de PTIP se trouve la nucléase Artemis qui, après son interaction avec PTIP de manière dommages-dépendante, va « nettoyer » des extrémités d'ADN et générer des extrémités franches pour permettre la promotion de la NHEJ (**Li and Xu, 2016**).

La réparation des DSB dépend également de la structure de la chromatine. Ainsi, les modifications d'histones font partie des nombreux mécanismes à prendre en compte dans le choix de la voie de réparation des DSB. Par exemple, à la suite d'un dommage, 53BP1 va s'associer à H4K20me2. Elle reconnaît également l'ubiquitinylation de l'histone H2A sur la lysine 15 (H2AK15ub) et ce sont ces deux modifications d'histones reconnues par 53BP1 qui vont permettre la promotion de la NHEJ (**Fradet-turcotte et al., 2014**). De même, la triméthylation de l'histone H3 (H3K36me3) catalysée par la méthyltransferase SETD2 sont nécessaires pour la réparation des DSB par la HR alors que la diméthylation (H3K36me2) présente sur plus de 40% des nucléosomes, promeut la NHEJ (**Aymard et al., 2014; Fnu et al., 2011**). Enfin, le dernier exemple est l'histone H1. Son ubiquitinylation sur la lysine 63 (H1K63ub) par RNF8 est lue par RNF168 ce qui induit l'ubiquitinylation de H2A (**Thorslund et al., 2015**).

Enfin, des études suggèrent que la compartimentation du noyau contribuerait au choix de la voie de réparation des DSB. Par exemple, les DSB localisées aux pores nucléaires sont plus permissives à la HR, alors que les DSB localisées à la membrane nucléaire sont plutôt réparées *via* la NHEJ alternative (Lemaitre et al., 2014).

2.4. La recombinaison homologue au secours des fourches de réplication

La recombinaison homologue est intimement liée à la réplication de l'ADN, escortant les fourches en cours de réplication pour les protéger et si nécessaire les réparer et les faire redémarrer. En effet, au cours de la phase S normale, les protéines de la HR sont détectées au niveau de la chromatine naissante avec les protéines de la machinerie de réplication (Sirbu et al., 2011). De plus, il a été montré qu'un défaut de la HR entraîne une diminution de la vitesse de progression de la fourche de réplication et ce, même en absence de stress exogène (Daboussi et al., 2008). Les protéines clés de la HR impliquées dans le processus de protection, réparation et redémarrage des fourches sont principalement RAD51 et BRCA2, aidées de nucléases et translocases.

Certains mécanismes par lesquels la HR intervient dans les processus de protection, de réversion et de redémarrage des fourches sont encore assez flous chez les mammifères car beaucoup moins étudiés que chez la levure par exemple. Ainsi, les sections qui vont suivre donneront uniquement un aperçu global du rôle de certains facteurs de la recombinaison homologue dans la protection, la réversion et le redémarrage des fourches.

2.4.1. La protection des fourches de réplication bloquées

Lors d'un arrêt de fourche, l'ADN simple brin qui en résulte est rapidement recouvert par RPA (voir la partie 2.1.3). RPA est ensuite rapidement remplacée par la recombinase RAD51. RAD51 est une protéine qui a pour particularité de promouvoir l'échange de brin se produisant lors de la recombinaison homologue pour la réparation des DSB. Elle est également responsable de la stabilité des fourches de réplication en prévenant leur dégradation excessive par la nucléase MRE11 par exemple (Hashimoto et al., 2010; Petermann et al., 2010). Au niveau des fourches de réplication bloquées, BRCA2 et d'autres protéines accessoires, favorisent la stabilisation du nucléofilament RAD51 le long de l'ADN double brin, protégeant aussi l'ADN nouvellement synthétisé de la dégradation nucléolytique. En effet, en absence de BRCA2 et sous traitement hydroxyurée prolongé, il a été montré que le brin d'ADN nouvellement dupliqué est dégradé par la nucléase MRE11, conduisant à une instabilité génétique (Schlacher et al., 2011, 2012). En plus de BRCA2, il a été montré que d'autres protéines de la voie FA (Fanconia Anemia) tels que FANCD2 et BRCA1 sont impliquées dans la protection des fourches (Kais et al., 2016; Tagliatela et al., 2017). Ainsi, de nombreux autres facteurs sont impliqués dans la protection des fourches de

réplication bloquées. Il est maintenant nécessaire de mieux comprendre s'ils fonctionnent en synergie, de manière épistatique ou s'ils protègent différents intermédiaires de réplication produits par différents types de stress de réplication.

2.4.2. La réversion des fourches de réplication

Souvent, les fourches de réplication bloquées subissent des remodelages importants avant de pouvoir de nouveau répliquer l'ADN correctement. Les fourches de réplication peuvent se réverser, c'est à dire qu'elles forment une structure de jonctions à quatre voies (en forme de patte de poulet ou « *chicken foot* ») qui ressemble à la jonction de Holliday (**Neelsen and Lopez, 2015; Rickman and Smogorzewska, 2019**). C'est un processus de protection qui permet à la fourche de réplication d'inverser sa course lorsqu'elle rencontre une lésion, empêchant sa progression à travers celle-ci et évitant son effondrement pour finalement reprendre la synthèse d'ADN sans rupture chromosomique (**Neelsen and Lopez, 2015; Quinet and Lemac, 2017**). On peut définir simplement la réversion de fourches comme étant un mécanisme général pour protéger l'intégrité des chromosomes en cours de réplication.

Comme pour la réparation des DSB, l'inversion de la fourche va être amorcée par le chargement de RAD51 sur l'ADN simple-brin. La formation des fourches réversées par RAD51 est indépendante de la présence de BRCA2 (montré par l'utilisation d'un dominant négatif de RAD51 : RAD51-T131P) alors qu'elle est nécessaire à la stabilisation du nucléofilament RAD51 sur les fourches réversées et empêche sa dégradation nucléolytique extensive (**Wang et al., 2015**). Le fait que la fonction ici de RAD51 soit indépendante de la présence de BRCA2 paraît assez surprenant sachant que la plupart du pool RAD51 dans la cellule est constitutivement lié à BRCA2 (**Reuter et al., 2014**). Dans un contexte où BRCA2 est absent, il semblerait que les protéines médiatrices de la recombinaison comme MMS22L-TONSL, les paralogues de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3) et RAD54 assistent la formation du nucléofilament RAD51 et de la fourche réversée (**Bugreev et al., 2011; Piwko et al., 2016**). Enfin, les ADN translocases SMARCAL1, ZRANB3 et HLTF sont également impliquées dans la réversion de fourches, en les stabilisant et empêchant ainsi l'instabilité génomique associée à la réplication (pour revues **Poole and Cortez, 2017; Quinet and Lemac, 2017**).

2.4.3. Le redémarrage des fourches de réplication

La convergence de fourche, permise grâce à l'existence d'une multitude d'origines dormantes, est un des mécanismes de sauvetage qui peut permettre à la fourche bloquée de redémarrer sans trop de difficultés. Les origines dormantes sont activées essentiellement par la voie ATR-Chk1 (**Courtot and Hoffmann, 2018**). Cependant, c'est un mécanisme limité, surtout dans les régions pauvres en origines de réplication comme les régions télomériques ou les régions où deux fourches de réplication

convergentes sont bloquées. Dans le cas où le sauvetage de fourche ne peut être effectué, la cellule doit faire appel à des mécanismes de redémarrage.

Le redémarrage des fourches de réplication bloquées par la recombinaison homologue est un mécanisme qui nécessite l'action coordonnée de RAD51 et de nucléases (**Petermann and Helleday, 2010**). Le redémarrage médié par la RH permet de « remettre sur rails » des acteurs de la réplication perdus lors du blocage de la fourche ou éventuellement de recharger un nouveau réplisome.

Lorsqu'une fourche de réplication est cassée, par la présence prolongée de HU et/ou générée par l'endonucléase Mus81 par exemple, une résection de la cassure doit avoir lieu. RAD51 est alors chargé sur l'ADN simple-brin puis est responsable de la recherche d'homologie (dans sa chromatide sœur physiquement détachée) et de l'échange de brin. Il y a ensuite invasion de brin et la formation d'une D-loop (voir chapitre 2.2.2.2 pour connaître le résultat de la formation de la D-loop) (**Ait Saada et al., 2018; Petermann and Helleday, 2010**). Dans le cadre de la réplication, ce mécanisme appelé BIR (« *break-induced replication* ») est effectué tardivement en phase S voire en début de phase G2 du fait d'un retard dans l'initiation de la synthèse d'ADN (**Kramara et al., 2018**). Dans le cas d'une fourche de réplication non cassée, les brins nouvellement synthétisés (de la fourche réversée ou non réversée) sont dégradés par MRE11/Exo1, afin de générer un ADN simple brin, permettant à RAD51 d'être recrutée. S'en suit une recherche d'homologie (dans le duplex ADN parental), une invasion de brin et la formation d'une D-loop (**Ait Saada et al., 2018**). Malheureusement, le redémarrage des fourches ne constitue pas un processus infaillible. En effet, pour ces deux types de redémarrage par la RH, des mutations et des réarrangements chromosomiques peuvent avoir lieu. Ceci est dû principalement à la nature de la séquence utilisée comme matrice pour le redémarrage.

3. Les protéines de liaison à l'ARN et la réponse aux dommages de l'ADN

La transcription ainsi que le contrôle de l'expression post-transcriptionnelle des gènes sont des mécanismes qui participent à la régulation de l'expression des gènes impliqués dans différents événements cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la réponse à différents stress ou encore la mort cellulaire. Comme vu dans le chapitre 2, les cellules doivent constamment répondre aux attaques d'origine environnementale ou endogène pour maintenir leur génome intact et ainsi le transmettre à la génération suivante. Dans ce contexte de réponse aux dommages de l'ADN, nous allons voir quelle est la contribution des protéines de liaison aux ARN, que ce soit du point de vue de la régulation post-transcriptionnelle des gènes de réponse aux dommages, que de leur implication directe aux sites de dommages.

3.1. Le rôle des protéines de liaison à l'ARN dans le contrôle de l'expression des gènes de réponse aux dommages de l'ADN

D'un point de vue chronologique, le DDR peut être considéré comme un processus en deux étapes. La première est la réponse rapide d'initiation, médiée principalement par les modifications post-traductionnelles (telles que les phosphorylations, ubiquitylations, méthylation) et les interactions protéine-protéine de nombreux substrats (voir chapitre 2). La seconde étape, nécessairement plus lente, est la réponse de maintenance qui implique la synthèse de nouveaux ARN qui peuvent être régulés au niveau de leur transcription, de leur épissage ou de la maturation de leurs extrémités 3' ou 5'. Entre ces deux étapes, les ARNm préexistants peuvent être régulés de manière post-transcriptionnelle à travers la modulation de leur stabilité et leur traduction permettant à la cellule un ajustement rapide. Ces étapes transcriptionnelles et post-transcriptionnelles sont régulées en grande partie par les RBP *via* leur liaison aux ARNm, aux transcrits naissants et aux ARN non codants. Des criblages protéomiques et fonctionnels à haut débit révèlent que ces protéines font partie des produits de gènes les plus modifiés post-traductionnellement par les protéines de signalisation des dommages de l'ADN ou nécessaires au DDR (**Matsuoka et al., 2007; Paulsen et al., 2009**).

Globalement, l'expression des gènes a tendance à être réprimée suite à un dommage. Cependant, la diminution de la stabilité et de la traduction des ARNm sont plus souvent observée que la répression de la transcription, et peut être renforcée par les RBP à travers deux mécanismes : le premier est la dissociation de HuR (« *human antigen R* »), une RBP qui permet la stabilité et la traduction de nombreux ARNm en réponse aux dommages de l'ADN (**Masuda et al., 2011**). Le deuxième mécanisme passe par la RBP KSRP (« *KH-type slicing regulatory protein* »), activée par ATM à la suite d'un dommage. Cette activation permet d'induire la maturation d'un large sous-ensemble de microARN (miRNA) par KSRP et donc d'inhiber la stabilité et/ou la traduction de leurs ARNm cibles en réponse à un dommage (**Zhang et al., 2011**).

Parallèlement à la répression globale de l'expression génique, un grand nombre de RBP sont responsables de la régulation post-transcriptionnelle positive de gènes du DDR. En effet, même si l'expression globale des gènes est réprimée en réponse aux dommages de l'ADN, il a été montré que les ARNm codants pour les protéines du DDR échappent à la répression de la transcription, c'est-à-dire qu'il existe un mécanisme compensatoire qui permet aux gènes du DDR d'être correctement exprimés. Ce mécanisme implique de manière évidente la régulation à tous les niveaux de l'expression du gène p53 (**Figure 19**), le gardien du génome, qui contrôle les checkpoints lors d'un dommage à l'ADN et qui influe sur l'activité de tous les systèmes de réparation de l'ADN. Ainsi, lors d'un dommage, l'expression post-transcriptionnelle de la protéine p53 est régulée par plusieurs RBP. Par exemple, les deux RBP liées,

hnRNP H et F interagissent avec une structure ARN de type G-quadruplexe (G4), une structure non-canonique qui s'établit entre les guanines situées en aval du site de polyadénylation. Cette interaction avec le G4-ARN permet de maintenir la maturation en 3' des pré-ARNm de p53 (Decorsiere et al., 2011). De plus, d'autres RBP sont impliquées dans l'induction de la traduction des ARNm de p53. Par exemple, la protéine MDM2, une E3 ubiquitine ligase, va interagir avec les ARNm de p53 à la suite de sa phosphorylation par ATM après un dommage. Cette interaction va permettre la liaison du complexe MDM2-ARNm p53 avec le complexe 5S pré-ribosomal et induire la traduction des ARNm de p53 (Gajjar et al., 2012). MDMX, un homologue de MDM2, également phosphorylée par ATM après un dommage, va agir en tant que protéine chaperonne des ARNm de p53 pour former une plateforme où MDM2 peut se lier pour ainsi renforcer son action d'activateur de la traduction (Malbert-mazancolas et al., 2007). De plus, il a été montré que de manière UV dépendante, HuR induit également la traduction des ARNm p53 dans les cellules de carcinome rénal, en se liant à leur partie riche en AU de la région 3' UTR (Mazan-Mamczarz et al., 2003). Des dizaines d'autres RBP induisent la traduction des ARNm de p53, que ce soit en se liant à leurs régions 5' UTR, 3' UTR ou codante. Cependant leur nombre est trop important pour permettre leur description de manière exhaustive. HuR joue également un rôle majeur dans la régulation de l'expression de p21 induite par les UV-C en améliorant la stabilité des ARNm de p21 dans le cytoplasme, où HuR est présent en grande quantité (Wang et al., 2000).

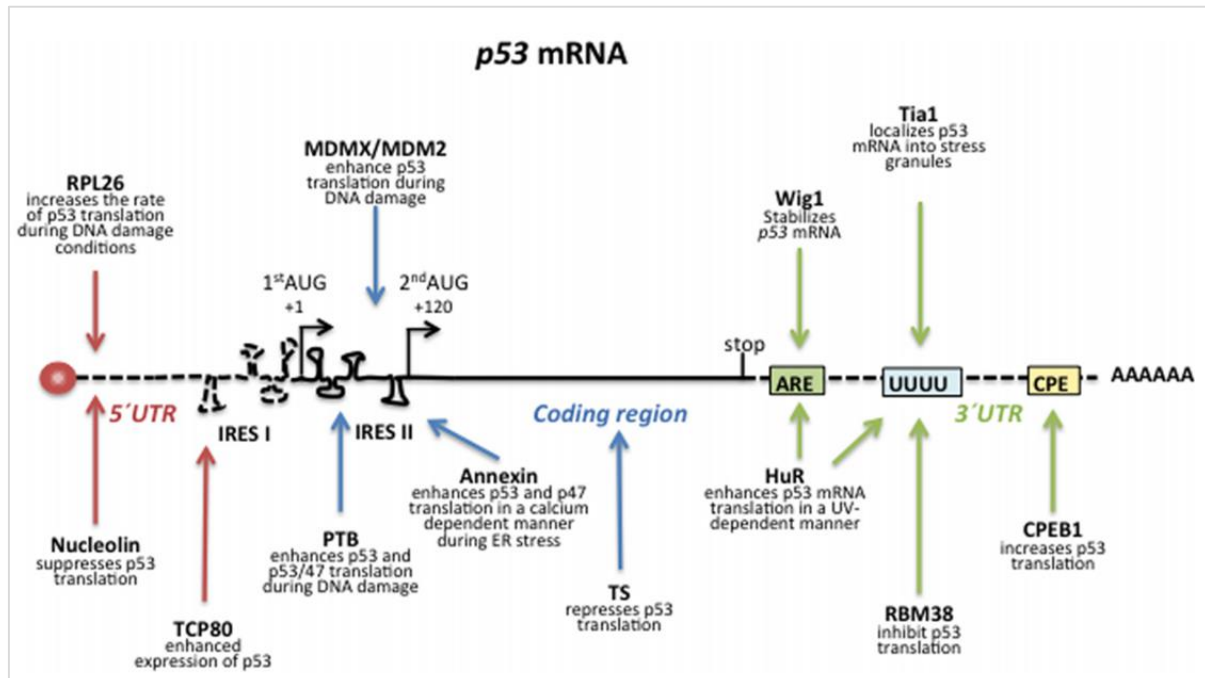


Figure 19 : Les multiples protéines de liaison aux ARNm de p53 et leur implication dans le contrôle de l'expression de p53 en réponse à différents types de dommages (d'après Haronikova et al., 2019).

Ainsi, en réponse aux dommages de l'ADN, les RBP jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes du DDR mais également dans le contrôle du destin cellulaire, et ceci à de

multiples niveaux transcriptionnels et post-transcriptionnels. Cependant, les RBP jouent également un rôle important dans la prévention des dommages de l'ADN et de l'instabilité du génome. Les mécanismes par lesquels les RBP sont capables de prévenir cette instabilité génétique font l'objet du prochain paragraphe.

3.2. Rôle des protéines de liaison aux ARN dans la prévention et la réparation des dommages de l'ADN

3.2.1. La prévention des dommages de l'ADN

Les RBP sont capables de prévenir la formation de dommages à l'ADN grâce au contrôle de la formation des R-loop. En effet, une importante source de cassures de l'ADN double-brin et donc d'instabilité génétique est la collision entre la transcription et la réplication pendant la phase S de gènes très longs ou très exprimés. Les ARN naissants pendant la transcription par la polymérase II s'hybrident avec l'ADN matrice simple brin (créant des hybrides ADN : ARN), déplaçant l'ADN non matrice et créant ainsi une structure à trois brins appelée des R-loop (ou boucle R) (**Skourti-Stathaki, 2014**). Des mécanismes de protection, régulés principalement par des RBP, permettent de surmonter la formation de R-loop et d'atténuer leurs effets néfastes afin de préserver l'intégrité du génome (**Nishida et al., 2017**). Ainsi, les RBP sont considérées comme des facteurs empêchant la formation des R-loop en s'accrochant à l'ARN naissant. Par exemple, il a été montré que les R-loop s'accumulent dans les cellules déplétées en SRSF1 et induisent un phénotype hypermutagène (**Li and Manley, 2005**). Le modèle serait que SRSF1 est chargé de manière co-transcriptionnelle sur le pre-ARNm naissant via le CTD (« *carboxy-terminal domain* ») phosphorylé de la polymérase II afin de favoriser son épissage mais aussi de prévenir la formation de R-loop (**Li and Manley, 2005**). SRSF1 en s'associant également à la topoisomérase I (TOP-I) permet de prévenir la formation des R-loop (**Tuduri et al., 2009**). TOP-I permet la relaxation de l'ADN et le clive transitoirement pour relâcher les contraintes topologiques. De nombreuses autres RBP modulent la relaxation de l'ADN ou son clivage par TOP-1. Ces RBP sont recensées dans **Czubaty et al., 2005**. Ces interactions entre RBP et TOP-1 préviennent ainsi la formation des dommages de l'ADN au niveau de loci fortement transcrits en relâchant les contraintes topologiques de l'ADN. La prévention de la formation des R-loop repose également sur l'activité du complexe THO/TREX-2 (contenant de nombreuses RBP). Ce complexe, ayant un rôle dans l'exportation des ARNm, permet de conditionner correctement et rapidement les ARNm pour leur export et ainsi les empêcher de se ré-hybridiser avec le brin d'ADN transcrit (**Bhatia et al., 2014**).

Jusqu'à très récemment, les R-loop étaient considérées uniquement comme source d'instabilité génétique en raison du risque accru d'effondrement de la fourche de réplication. Cependant, il existe

de plus en plus d'exemples montrant qu'elles sont impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN et la préservation de la stabilité du génome (voir chapitre 3.4.2.3).

Les RBP pourraient également prévenir les dommages de l'ADN à travers leur rôle dans certains processus du métabolisme de l'ADN tels que la réplication ou la biogénèse des télomères dont l'altération déclenche le DDR. Par exemple, pendant la réplication, hnRNP A1 est impliquée dans la maturation des fragments d'Okazaki *via* son interaction avec FEN1 et stimule son activité enzymatique. Plus précisément, hnRNPA1 interagit physiquement *via* son domaine C-terminal GAR avec FEN1 et stimule fortement le clivage du flap court de l'ADN. (Chai et al., 2003). Une autre RBP, l'hélicase UPF1, interagit avec l'ADN polymérase δ et s'associe à la chromatine après un dommage à l'ADN de manière ATR dépendante pour faciliter la réparation de l'ADN (Azzalin and Lingner, 2006). Enfin, de nombreuses hnRBP, telles que hnRNP A1, FUS, TRF1 et 2, hnRNP F, hnRNP C et hnRNP U, AUF1, hnRNH1 et 2, Yra1 et hnRNPA18, sont impliquées dans le contrôle des activités télomériques à plusieurs niveaux (pour revue Nishida et al., 2017). La plupart du temps, l'inhibition ou la dérégulation de ces RBP induisent une diminution des activités télomériques et un raccourcissement prématuré des télomères. Ceci augmente l'instabilité génétique démontrant leur rôle dans la préservation de l'intégrité du génome. Finalement, très récemment, une étude a montré que la collaboration des RBP NonO et SFPQ (qui lie le transcrit TERRA) permet la suppression des hybrides ARN : ADN et les défauts de réplication aux télomères afin d'assurer l'intégrité télomérique (Petti et al., 2019).

3.2.2. La réparation des dommages de l'ADN

Ces dernières années, il a été montré qu'un nombre important de RBP sont relocalisées directement au niveau de sites de dommages à l'ADN, suggérant qu'elles ont un rôle important dans la réparation des dommages. Elles sont recrutées aux sites de dommages dépendamment ou non de leur liaison à l'ARN et peuvent soit se lier à l'ADN, soit interagir avec des facteurs de réparation de l'ADN. Des exemples de RBP vont être présentées pour illustrer ce propos.

L'activité de la poly(ADP-ribose) polymérase PARP, une glycosyltransférase cruciale pour la signalisation des lésions et l'activation des réparations, est requise pour le recrutement de certaines RBP. En effet, une grande partie des protéines interagissant avec PARP sont des RBP qui sont attirées aux sites de dommages de l'ADN *via* leur interaction avec la chaîne poly(ADP-ribose) (PAR). Un grand nombre d'entre elles appartiennent à la famille des facteurs d'épissage. Sont retrouvées par exemple : FUS, hnRNP G (RBMX) ou encore NonO/p54^{nrb} (Adamson et al., 2012; Britton et al., 2014; Krietsch et al., 2012; Mastrocola et al., 2013). RBMX (RNA Binding Motif Protein X-Linked) aussi appelée hnRNP G (heterogenous nuclear ribonucleoprotein G) a un rôle dans l'épissage alternatif (Heinrich et al., 2009). En 2012, un criblage de siRNA à l'échelle du génome a permis d'identifier RBMX comme un régulateur

positif de la recombinaison homologue et de la résistance aux dommages. Il s'accumule transitoirement aux sites de dommages de l'ADN causés par des microirradiations laser et ceci de manière PARP dépendante (**Adamson et al., 2012**). RBMX est également capable de se lier aux cassures double-brin pour les protéger de la dégradation et augmenter la fidélité de la jonction des extrémités d'ADN (**Shin et al., 2007**). Les RBP FUS et NonO/p54^{nrb} sont relocalisées aux sites de dommages grâce à l'interaction de leurs motifs de liaison à l'ARN avec les chaînes PAR. FUS génère, après liaison aux chaînes PAR à la suite d'un dommage, des compartiments dynamiques dans lesquels l'ADN endommagé s'accumule pour faciliter sa reconnaissance par les facteurs de réparation de l'ADN (**Singatulina et al., 2019**). Le recrutement de FUS aux DBS améliore la phosphorylation de H2AX et le recrutement des protéines du DDR. Enfin, la RBP NonO/p54^{nrb} stimule la NHEJ et réprime la HR à la suite d'un dommage et ce de manière PARP-1 dépendante (**Krietsch et al., 2012**).

De nombreuses autres RBP ne nécessitent pas de se lier aux chaînes PAR pour promouvoir la réparation de l'ADN suite à un dommage mais sont capables de se lier directement à l'ADN ou aux facteurs de réparation pour agir tel un senseur de dommages. PRP19, une RBP ubiquitine ligase impliquée dans l'assemblage correct du spliceosome a été retrouvée à de nombreux postes au sein du DDR. En effet, son ubiquitylation suite à un dommage ne lui permet plus d'interagir normalement avec des facteurs d'épissages (CDC5L, PLRG1 ou SPF27) mais la rend disponible pour la réparation de l'ADN (**Lu and Legermahajanski, 2007**). Elle se lie à l'ADN double-brin ainsi qu'à une enzyme responsable de l'ajout de nucléotides aux extrémités (TdT :terminal deoxynucleotidyl transferase) générées lors de la recombinaison V(D)J, ce qui va permettre aux protéines de la NHEJ de sceller ces extrémités (**Mahajan and Mitchell, 2003**). PRP19 est également impliquée dans la réparation de l'ADN par la HR. Il a été montré qu'elle se localise directement à l'ADN simple brin généré à la suite d'un dommage *via* sa liaison directe à RPA, qui va ensuite être ubiquitylé par PRP19 lui-même pour faciliter l'accumulation d'ATRIP aux sites de dommages (**Li et al., 2014; Wan and Huang, 2014**). Une autre RBP telle que SFPQ (splicing factor proline and glutamine-rich) est responsable, lorsqu'elle se lie à RAD51 et dans un contexte où RAD51 est en faible concentration dans la cellule, de la stimulation de l'échange de brin lors de la HR (**Morozumi et al., 2009**). Le facteur d'épissage hnRNP C, quant à lui, est recruté aux sites de dommages. Il fait partie du complexe PALB2/BRCA2 et aide à la coordination de l'expression des gènes et à la réparation de l'ADN (**Anantha et al., 2013**). Enfin, il a été montré que sous traitement à l'oxaliplatine de cellules du cancer colorectal, la RBP hnRNP L se fixe aux protéines 53BP1 et BRCA1 *via* ses domaines RRM pour faciliter leur recrutement aux sites de dommages. Lorsque hnRNP L est déplétée, ni 53BP1 ni BRCA1 ne sont recrutées (**Hu et al., 2019a**).

Ainsi, ces quelques exemples montrent à quel point les RBP sont nombreuses à être directement impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN et le maintien de l'intégrité du

génomique. Parallèlement, de nombreuses RBP peuvent être régulées directement par les protéines du DDR.

3.3. Régulation des RBP par les protéines du DDR

A la suite d'un dommage, de nombreuses RBP sont régulées directement par le DDR. Ces régulations passent par des modifications post-transcriptionnelles telles que la phosphorylation majoritairement, ou l'acétylation des RBP, mais également par leur relocalisation subcellulaire pour coordonner les différents aspects du métabolisme de l'ARN et de l'ADN. Les régulations des quelques RBP par les protéines du DDR sont citées ci-après.

Dans les années 2010, de nombreux criblages phosphoprotéomiques ont identifié les RBP comme catégorie majeure dont la phosphorylation est régulée par les dommages de l'ADN (**Beli et al., 2012; Bennetzen et al., 2010; Blasius et al., 2011**). De nombreuses RBP sont la cible de kinases majeures, senseurs du DDR telles que ATM, ATR et DNA-PK et des effecteurs comme Chk1 ou Chk2. En effet, ATM est responsable de la phosphorylation de FUS sur le résidu S42 en réponse aux agents causants des DSB, bien que le rôle de phosphoFUS reste à élucider (**Gardiner et al., 2008**). La protéine HuR est régulée par ATM/ATR *via* l'activation de Chk1 et Chk2 (**Kim et al., 2010**). A la suite d'un dommage, Chk1 phosphoryle (et inactive) Cdk1, une kinase qui en situation normale phosphoryle HuR sur le résidu S202. HuR non phosphorylée est transportée dans le cytoplasme et permet la modulation de la stabilité et de la traduction des ARNm, incluant ceux codant des protéines anti-apoptiques telles que Bcl-2 ou Mcl-1 (**Kim et al., 2008**). D'autre part, HuR est phosphorylée par Chk2 sur les résidus S88, S100 et T118 à la suite d'une exposition de cellules au peroxyde d'hydrogène, ce qui induit la dissociation de HuR des ARNm codant pour la protéine SIRT1, impliquée dans la survie cellulaire et ayant également une activité anti-apoptotique (**Abdelmohsen et al., 2007**). Enfin, Chk2 phosphoryle également HuR à la suite d'un dommage induit par la camptothécine, menant à la stabilisation de l'ARNm de RhoB (une GTPase impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires). Ceci conduit à l'activation, par RhoB, de la phosphatase PP2A et la déphosphorylation de γ H2AX pour promouvoir la réparation correcte des DSB par la HR (**Mamouni et al., 2014**).

La phosphorylation des RBP dépendante du DDR peut également réguler leur activité. Par exemple, la liaison et la phosphorylation de KSRP par ATM (vu plus haut) induit la biogénèse de micro-ARN pour supprimer l'expression de leurs gènes cibles après induction d'un dommage (**Zhang et al., 2011**). La phosphorylation de hnRNP A0 et TIAL1 (« *TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1* ») par MK2 (« *mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein-kinase 2* ») et p38 MAPK, respectivement, induisent une augmentation de la stabilité de l'ARNm Gadd45 α (« *growth arrest and DNA damage-inducible, alpha* »), codant pour la protéine Gadd45 α , un régulateur du cycle

cellulaire (Reinhardt et al., 2009). En plus de la phosphorylation, les RBP peuvent subir d'autres types de modifications post-transcriptionnelles suite à un dommage. En effet, à la suite d'un traitement au cisplatine de cellules d'adénocarcinome pulmonaire H358, le facteur d'épissage SRSF2 est hypoacétylée (normalement hyperacétylée par Tip60) et hyperphosphorylé (par les kinases SRPK1 et SRPK2). Cet état hypoacétylé/hyperphosphorylé de SRSF2 induit l'épissage des pré-ARNm de la caspase-8, entraînant une augmentation de l'apoptose et une inhibition de la croissance cellulaire (Edmond et al., 2011). De plus, en 2013, une analyse protéomique globale des protéines PARylées en réponse à quatre types de stress génotoxiques (H₂O₂, MMS, UV, IR) a été entreprise. Un grand nombre de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN ont été retrouvées, en particulier 10 protéines sont PARylées à la suite des quatre types de stress infligés aux cellules dont les RBP RBMX, FUS et TAF15 (Jungmichel et al., 2013).

Comme vu précédemment, ces dernières années ont été marquées par la découverte d'un nombre grandissant de RBP ayant un rôle dans le DDR et constituent ainsi une nouvelle classe d'acteurs du DDR possédant une activité de liaison à l'ARN. En 2017, ces nouveaux acteurs ont été regroupés sous le terme de DDRBP (Dutertre and Vagner, 2017a). Aujourd'hui encore, malgré leurs fonctions bien établies dans la régulation de l'expression des gènes, il n'est pas clairement établi si la fonction des RBP aux sites de dommages est dépendante de leur liaison à l'ARN car certaines RBP possèdent des RBD pouvant également lier l'ADN, les protéines ou encore les chaînes PAR. Cependant, il est de plus en plus évident, et cela fera l'objet du prochain paragraphe, que l'ARN lui-même est impliqué aux sites de dommages de l'ADN et que certaines protéines classiques du DDR elles-mêmes possèdent une activité de liaison à l'ARN faisant ainsi grandir cette nouvelle classe de DDRBP. La question est de savoir quels types d'ARN endogènes peuvent être reconnus par les DDRBP et quels sont les rôles de ces interactions dans le DDR.

3.4. Le contrôle de la réparation de l'ADN par l'ARN

Etant donné la contribution importante des RBP dans le DDR, il n'est pas surprenant que l'ARN lui-même soit désormais impliqué dans le mécanisme de réparation des dommages à l'ADN.

3.4.1. Les (pré)-ARN messagers : cibles des protéines classiques du DDR

Comme discuté auparavant, en réponse aux dommages de l'ADN, de nombreuses RBP se lient classiquement aux (pré)-ARNm pour réguler directement l'expression (post)-transcriptionnelle de gènes spécifiques du DDR. Ce paradigme s'applique non seulement aux RBP classiques mais également aux protéines classiques du DDR. Par exemple, la protéine BRCA1 est retrouvée dans un complexe contenant des facteurs de maturation de l'ARN (appelé « *BRCA1-mRNA splicing complex* ») induisant l'épissage et

la stabilité de transcrits codants pour des protéines du DDR en réponse aux dommages de l'ADN (**Savage and Harkin, 2015**). De plus, l'hétérodimère Ku70/80 se lie directement sur une structure en forme de boucle bombée (« *bulged stem-loop* ») dans la région 3' UTR de l'ARNm de p53 pour réprimer sa traduction en situation normale. Lors d'un dommage à l'ADN, cette interaction est inhibée par l'acétylation de Ku70/80, ce qui va permettre sa dissociation de l'ARNm de p53. P53 est alors traduit et favorise l'apoptose cellulaire (**Lamaa et al., 2016**). Egalement, l'ARNm de p53 est la cible de MDM2 après sa phosphorylation par ATM, pour induire la traduction de p53 après un dommage (**Gajjar et al., 2012; Naski et al., 2009**). A travers ces quelques exemples, il paraît évident que la liaison des protéines classiques du DDR aux ARNm joue un rôle important dans la réponse précoce aux dommages de l'ADN par le biais d'une forte traduction des ARNm codants pour les protéines du DDR.

3.4.2. Les ARN non-codants courts et longs : des acteurs à part entière du DDR

Mis à part les ARNm, les DDRBP peuvent lier d'autres types d'ARN tels que les ARN non-codants courts (le plus souvent des micro-RNA) et longs. Les ARN non-codants sont des ARN issus de la transcription mais qui ne codent pas pour des protéines. Ils assurent de nombreuses fonctions dans la cellule et sont impliqués directement dans la stabilité du génome.

3.4.2.1. Les ARN non-codants courts (*micro-ARN*)

Les micro-ARN (miRNA) sont de courts ARN simple-brin de 19 à 24 nucléotides qui régulent l'expression des gènes au niveau post transcriptionnel, soit en clivant l'ARNm cible, soit en réprimant sa traduction. Ils sont générés par la polymérase II (pol II) à partir de régions intergéniques ou de régions introniques/exoniques lors de la transcription de leur gène hôte. Le processus de maturation du miRNA fait intervenir plusieurs enzymes dont Drosha, Dicer et Ago2 (**Krol et al., 2010**). L'expression et la biogénèse de miRNA peuvent être affectées par les dommages de l'ADN alors que certains miRNA régulent les facteurs de réparation à l'ADN. En effet, lors d'un dommage à l'ADN, il y a induction de l'expression de miRNA qui est essentiellement dépendant de l'expression de la protéine p53. Par exemple, la transcription des miRNA miR-34a, induit par p53, entraîne l'apoptose des cellules et l'arrêt du cycle cellulaire en G1 supprimant la prolifération des cellules traitées à la doxorubicine (**Tarasov et al., 2007**). De la même manière, p53 induit l'expression des miRNA miR-192, miR-194 et miR-215 après un stress génotoxique (doxorubicine) induisant l'arrêt du cycle cellulaire *via* l'accumulation de la protéine p21 (**Braun et al., 2008**). Ces études, parmi d'autres, suggèrent que la régulation de l'expression des miRNA par p53 module la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN à travers la régulation des checkpoints du cycle cellulaire et de l'apoptose. En plus de p53, d'autres protéines du DDR régulent l'expression de miRNA. Par exemple, BRCA1 réprime la transcription des miRNA miR-155, un oncomir

via son association avec l'histone désacétylase HDAC2, qui a son tour, désacétyle l'histone H2A et H3 sur le promoteur miR-155 (**Chang et al., 2011**).

Certaines protéines du DDR régulent la biogénèse des miRNA. C'est le cas de BRCA1 qui module la biogénèse des miRNA en phosphorylant et en interagissant avec Drosha et d'autres composants responsables des étapes précoces de la biogénèse des miRNA (**Kawai and Amano, 2012**). Ceci est également permis grâce à l'interaction du domaine de liaison à l'ADN de BRCA1 qui reconnaît la structure secondaire des pré-miRNA (forme immature des miRNA) en forme de tige-boucle (**Kawai and Amano, 2012**). Autre exemple, ATM, en phosphorylant et interagissant avec KSRP, un composant des complexes Drosha et Dicer, régule également la maturation et la biogénèse des miRNA. En effet, KSRP, qui se lie au pri-miRNA, induit, lorsqu'il est phosphorylé par ATM, le recrutement de ces pri-miRNA pour être pris en charge par Drosha et Dicer (**Trabucchi et al., 2009**). Un dernier exemple est la protéine p53, indépendamment de son rôle dans la transcription des miRNA, facilite la maturation des pri-miRNA en pré-miRNA *via* son interaction avec l'hélicase DDX5, un composant du complexe Drosha-DGCR8. Cette interaction conduit à l'augmentation des niveaux de miRNA matures tels que miR-16, miR143 et miR-145 (**Suzuki et al., 2009**).

Enfin, comme vu précédemment, l'expression et la biogénèse des miRNA sont régulées par certaines protéines du DDR mais ces dernières peuvent à l'inverse être régulées par les miRNA. Par exemple, ATM est la cible du miRNA miR-421, qui supprime son expression en se liant au 3' UTR de son transcrite suite à l'application de radiations ionisantes (**Hu et al., 2010**). BRCA1 est également la cible de miRNA. En effet, la répression du miRNA miR-182 conduit à l'augmentation des niveaux de la protéine BRCA1 et protège les cellules de la mort cellulaire induite par les IR. Au contraire, la surexpression de ce même miRNA réduit les niveaux de BRCA1, induisant un défaut de HR et rendant les cellules hypersensibles aux IR (**Moskwa et al., 2011**). Un grand nombre d'autres miRNA régule l'expression des protéines du DDR qui globalement provoque leur inhibition (**Figure 20**) (**He et al., 2016**).

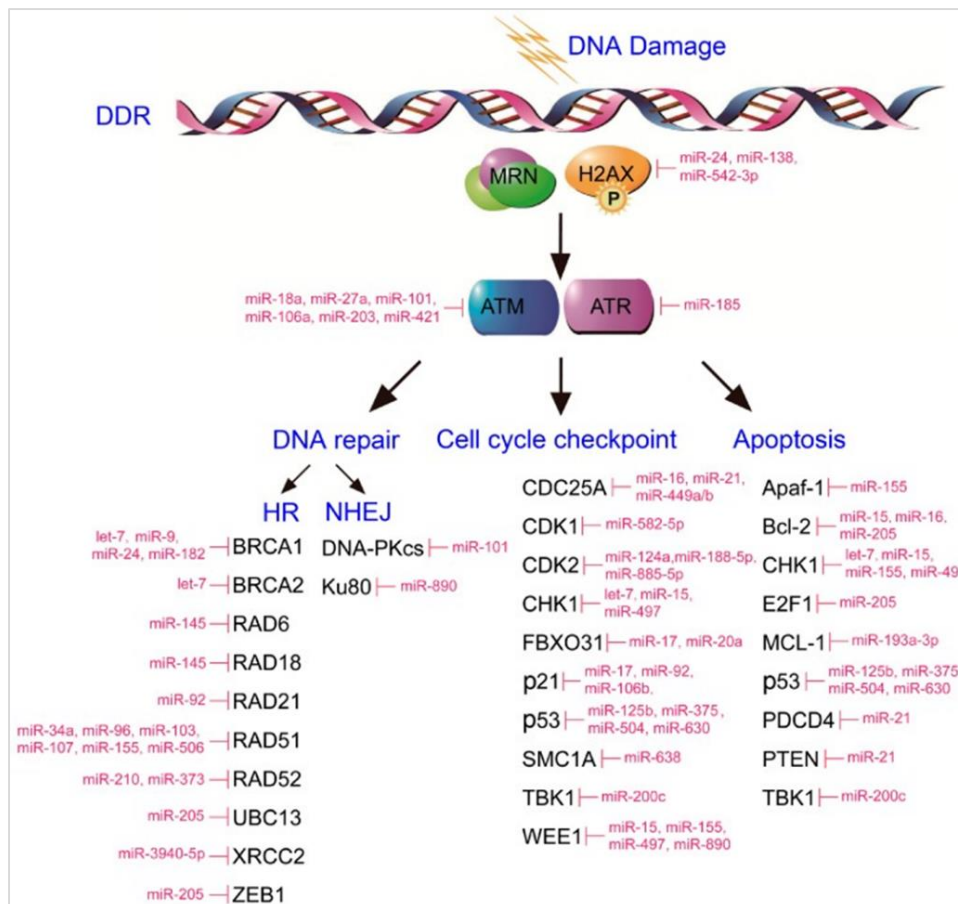


Figure 20 : Principaux miRNA affectant les composants du DDR. D'après He et al., 2016.

La régulation négative de l'expression des protéines du DDR par les miRNA est donc un aspect très important à prendre en compte dans l'étude des réponses aux traitements anti-cancéreux (chimiothérapie et radiothérapie). Les recherches sur les miRNA en tant qu'outils et biomarqueurs thérapeutiques sont de plus en plus pertinentes. Cependant, il s'agit d'un réseau très complexe qui nécessite des études complexes pour clarifier la corrélation entre les miRNA et le DDR (He et al., 2016).

3.4.2.2. Les ARN non-codants longs (lncRNA)

Au-delà des miRNA, les ARN longs non-codants (lncRNA) ont émergé ces dernières années comme étant des acteurs importants du DDR (pour revue Su et al., 2018). Les lncRNA sont transcrits par la pol II, ne codent pas pour des protéines et ont une taille minimale de 200 nts (Mercer et al., 2009). Ces ARN ont longtemps été considérés comme des artefacts de la transcription (Gutschner and Diederichs, 2012). Cependant, de plus en plus d'évidences montrent que ces ARN sont des molécules actives ayant des rôles critiques dans la carcinogenèse devenant ainsi des nouveaux biomarqueurs de diagnostic, de traitement et de pronostics du cancer. Les lncRNA peuvent réguler l'expression des gènes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, réguler les modifications d'histones et l'épigénétique, ainsi que l'épissage des ARN (Fang and Fullwood, 2016). En fait, ces lncRNA servent en

tant que plateformes ou guides régulant les interactions protéine-protéine ou ADN-protéine, en tant que leurres qui se lient aux protéines ou aux miRNA, ou en tant qu'activateur de l'expression génique. Une nouvelle fonction des lncRNA a émergé ces dernières années, il s'agit de la régulation du DDR. Par exemple, le lncRNA DDSR1 (« *DNA damage-sensitive RNA1* ») identifié à la suite d'un criblage complet des transcrits d'ARN dans des fibroblastes humains de peau exposés à différents agents génotoxiques. Ce lncRNA est impliqué dans la promotion de la réparation des DSB par la HR en s'associant avec différents composants de la voie de la HR incluant BRCA1 et hnRNPUL1 (RBP impliquée dans la résection des extrémités d'ADN et la réparation par la HR) (Sharma et al., 2015). Un autre lncRNA, LINP1 (« *lncRNA in NHEJ pathway 1* »), surexprimé dans les cancers du sein triples négatifs, lui, se lie directement à Ku80 et DNA-PKcs au niveau de deux régions ARN distinctes en réponse aux IR, et agit en tant que plateforme pour ces protéines et induit la voie de la NHEJ (Zhang et al., 2016). PANDA (« *p21-associated lncRNA DNA damage activated* ») est un lncRNA induit après un dommage de l'ADN de manière p53 dépendante. Il est responsable de la régulation de l'apoptose en interagissant avec le facteur de transcription NF- κ B. Cette interaction permet l'inhibition de la liaison de NF- κ B aux promoteurs des gènes liés à l'apoptose réprimant ainsi l'apoptose (KOTAKE et al., 2017). Dans un contexte télomérique, Ku70/80 lie un composant de la télomérase (hTR/TERC), un lncRNA qui sert à la fois de modèle et de plateforme au sein des télomères. La liaison de Ku à hTR permet l'association de la télomérase aux télomères, le maintien de la longueur des télomères et la réparation des DSB (Ting et al., 2005). Le lncRNA TERRA (« *telomeric repeat-containing RNA* ») lui, participe à la réparation des dommages des télomères défectueux (Cusanelli and Chartrand, 2015). Dans un autre contexte, le lncRNA TODRA (transcrit dans le sens opposé de RAD51) est transcrit en amont de RAD51, empêchant la transcription de RAD51 et donc affectant la réparation correcte des DSB dépendant de RAD51 par la HR (Gazy et al., 2015). Enfin, le lncRNA HOTAIR (« *HOX antisens intergenic RNA* ») est un ARN oncogénique régulé positivement dans différents cancers humains. Il a été montré qu'il est impliqué dans la résistance au platine dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire et chez les patientes. HOTAIR est exprimé en réponse aux dommages de l'ADN induit par le platine et en retour permet la phosphorylation de Chk1 ce qui inhibe l'apoptose des cellules (Öze et al., 2016). Très récemment, il a été montré que l'inhibition de HOTAIR sensibilise les cellules de cancer du sein aux IR ce qui est corrélé avec l'augmentation de l'expression d'un miRNA, miR-218, un ARN endogène compétitif de HOTAIR (Hu et al., 2019b).

Ces quelques exemples de régulations par les lncRNA donnent donc la preuve que ces derniers jouent un rôle critique dans divers processus biologiques et pathologiques. Une compréhension approfondie du rôle des lncRNA dans le DDR permettrait d'élargir les connaissances de ces ARN dans la réparation des dommages de l'ADN, la progression du cancer et la résistance aux chimiothérapies et radiothérapies, qui pourrait même améliorer la prise en charge thérapeutique du cancer.

3.4.2.3. Les ARN produits aux sites de dommages

Un des moyens utilisés par les laboratoires pour la recherche d'une éventuelle contribution d'un ARN dans la réparation de l'ADN est le traitement à la RNase de cellules suivies de l'immunofluorescence des facteurs de réparation. Par exemple, 20 minutes après l'exposition de cellules aux radiations ionisantes, la formation des foyers 53BP1 est altérée. Ce phénomène peut être inversé par incubation de ces mêmes cellules avec des ARN nucléaires provenant d'autres cellules (Francia et al., 2012a; Pryde, 2005a). Ces résultats suggèrent un rôle direct de l'ARN dans le recrutement de facteurs de réparations de l'ADN. De cette constatation, il est alors possible de proposer un mécanisme d'action pour ces protéines de réparation et/ou de chercher et éventuellement de trouver l'origine des ARN présents aux sites de dommages de l'ADN.

C'est alors qu'en 2012, une autre classe d'ARN impliqués dans l'activation du DDR a été identifiée (Francia et al., 2012a). Il s'agit des DDRNA (« *DNA-damage-response RNA* »). Les auteurs ont montré qu'il s'agit de petits ARN produits par les endonucléases dicer et drosha en réponse aux dommages de l'ADN à partir des régions flanquantes des DSB. En 2016, il a été montré dans les cellules humaines qu'un prétraitement à la RNase, où l'inactivation de dicer et drosha n'empêchait pas le recrutement primaire des senseurs du DDR tels que NBS1 (ou NBN) aux sites de dommages mais empêchait le second recrutement des médiateurs du DDR tels que 53BP1 et MDC1 (Francia et al., 2016). Ceci est consistant avec les observations de 2005 de Pryde et al. qui montrent que le recrutement de 53BP1 aux sites de dommages à l'ADN *via* le domaine Tudor est dépendant de la présence d'ARN, bien que son association directe avec l'ARN n'ait pas été démontrée (Pryde, 2005a). Il y deux ans, grâce à un ensemble d'expériences remarquables et de techniques sophistiquées en imagerie moléculaire et en détection d'ARN intracellulaires, Michelini et al. sont allés plus loin dans l'étude des DDRNA dans le contexte de réparation des DSB. Ils ont montré que les DDRNA ne se lient pas aux extrémités d'ADN cassées mais que leur localisation aux sites de dommages est induite par la RNA pol II. En explorant le paysage transcriptionnel aux voisinages du site du dommage, les auteurs ont découvert que ce sont des lncRNA qui sont transcrit de manière bidirectionnelle de part et d'autre de la lésion, les dilncRNA (« *damage-induce long non-coding RNA* ») (Michelini et al., 2017a). Après l'inhibition de drosha, les dilncRNA s'accumulent après un dommage tandis que les DDRNA, augmentant normalement après dommages, diminuent après l'inhibition de drosha. Ils ont ainsi apporté la preuve que les dilncRNA sont les précurseurs des DDRNA. Sur la base des observations de 2005, ils ont également montré que 53BP1 lie les DDRNA et les dilncRNA *via* son domaine Tudor. Pour résumer, Michelini et al. ont montré que le recrutement de la RNA pol II aux sites de dommages induit la synthèse bidirectionnelle de dilncRNA qui vont être processés par dicer et drosha pour générer les DDRNA qui s'apparient avec les dilncRNA nouvellement synthétisés aux extrémités cassées. Les complexes dilncRNA-DDRNA vont s'associer à

53BP1 et alimenter la formation de foyers de DDR aux sites de dommages. (Figure 21) (Michelini et al., 2017).

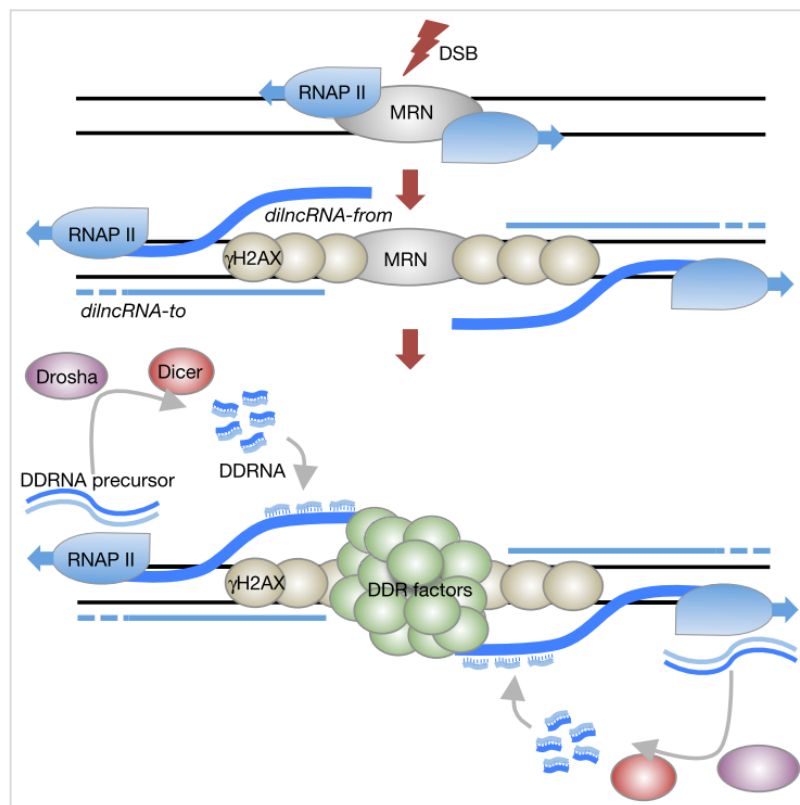


Figure 21 : La formation des foyers de réparation des dommages aidée par la transcription. Le complexe MRN recrute la pol II aux sites de dommages, induisant la synthèse bidirectionnelle de dilncRNA (« DDRNA precursor ». Dicer et drosha vont traiter ces ARN double-brin et générer les DDRNA, qui vont s'apparier aux dilncRNA naissants. L'ensemble va s'associer à 53BP1 et alimenter la formation des foyers au site de dommages. Réadapté de Michelini et al., 2017

Ainsi, l'hypothèse actuelle, émergeant de cette étude, suggère que les ARN impliqués dans la réparation des dommages sont issus d'évènements transcriptionnels se produisant après un dommage, aux sites de cassures. Ces évènements transcriptionnels se produiraient après l'induction d'une lésion de l'ADN et produiraient des ARN à partir de l'ADN cassé (comme vu précédemment) (Michelini et al., 2017a). Pour être plus précis dans le raisonnement de ces propos, d'autres facteurs sont pris en compte. A la suite d'une cassure de l'ADN, l'environnement chromatinien du DSB ressemble fortement à celui d'une région transcriptionnelle active, c'est à dire une chromatine décondensée et la présence de certaines modifications d'histones, notamment l'ubiquitylation de H2A (uH2A) (Shanbhag et al., 2010). Jusqu'à très récemment, on pensait que la transcription à proximité d'une cassure était inhibée pour empêcher de transcrire une région d'ADN cassée (Pankotai et al., 2012; Shanbhag et al., 2010). Cependant, les études récentes prouvent le contraire et il serait possible d'imaginer que les motifs chromatiniens similaires entre les sites de dommages et la transcription pourraient permettre le recrutement d'ARN polymérases aux extrémités cassées et d'induire la transcription bidirectionnelle de

lncRNA induite par les dommages (dilncRNA) (Burger et al., 2019; Michelini et al., 2017; Wei et al., 2012). En fait, il a été montré qu'il s'agit d'un mécanisme d'induction transcriptionnelle distinct, uniquement régulé par le DDR, indépendant de l'activité de promoteurs (Vitor et al., 2019). De plus, la production de DDRNA matures produits par dicer et drosha à partir des dilncRNA est un mécanisme dépendant de l'activité transcriptionnelle du locus endommagé et pourraient également être utilisés pour la dégradation d'ARNm potentiellement endommagés. Cependant, la suppression de ces transcrits n'aurait pas d'impact sur le recrutement des facteurs de réparations aux sites de dommages, comme le montraient les études de Pryde et Francia. Il existerait donc un/plusieurs autre(s) mécanisme(s) expliquant la diminution du recrutement des facteurs de réparation après un dommage lorsque les ARN sont dégradés. Il a été montré récemment que les dilncRNA et DDRNA s'hybrident (formation d'une R-loop) avec les extrémités d'ADN cassées (Burger et al., 2019; D'Alessandro et al., 2018). Ici, par exemple, Burger et al. ont montré que BRCA2 reconnaît les hybrides ARN : ADN, ce qui permet de moduler leur niveaux *via* le recrutement de la RNase H2 par BRCA2 dépendamment des DSB. Ceci suggère que les DDRNA pourraient être utilisées comme un signal spécifique pour des événements post-DSB (recrutement de facteurs réparation par exemple) mais également pour aider les événements liés au remodelage de la chromatine. Ce dernier propos peut être envisagé car des études montrent l'importance des R-loop dans le contrôle de la conformation chromatinienne (Chen et al., 2015).

Enfin, une hypothèse alternative à celle citée précédemment pour l'implication de l'ARN dans le DDR est la possibilité qu'un transcrit produit avant l'induction des dommages soit traité et incorporé (formation d'une R-loop) dans le processus de réparation en réponse aux DSB. Ceci est particulièrement vrai pour la réparation de gènes actifs, où la production d'ARN est importante. Ce mécanisme est appelé « *RNA-templated repair* », littéralement : réparation basée sur l'ARN. C'est un mécanisme mis en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Storici et al., 2007), où il a été montré ici que des oligonucléotides ARN sont utilisés comme matrice pour la synthèse d'ADN lors d'une réparation d'un dommage. Une autre étude, également réalisée chez la levure, a montré qu'un transcrit issu du gène subissant le dommage fournit une matrice pour sa réparation qui est dépendante de RAD52 (Keskin et al., 2014). Cependant, ce mécanisme n'a été observé que dans des mutants dépourvus de RNase H1 et H2, donc déficientes en systèmes de traitement des hybrides ARN : ADN, soulevant la question de savoir si cette voie de réparation se produit dans les cellules normales. Ce mécanisme de réparation basé sur l'ARN dépendant de RAD52 pourrait également avoir lieu chez les eucaryotes supérieurs. Plus précisément, dans les neurones post-mitotiques par exemple, RAD52 est recruté aux dommages de manière dépendante de la présence d'ARNm naissants générés au cours de la transcription (Welty et al., 2018).

Finalement, ce mécanisme pourrait expliquer comment les sites hautement transcrits augmentent le taux de recrutement des facteurs de réparation rapidement, agissant comme un mécanisme de sauvegarde des régions les plus transcrites donc actives du génome (**Bader et al., 2020; Marnef et al., 2017**). A ce jour, même si ce modèle paraît cohérent, aucune donnée actuelle ne fournit la preuve directe que la réparation est basée sur l'ARN lui-même.

En se basant sur nos connaissances et notre compréhension actuelles, il se pourrait que ces deux mécanismes, i.e. la transcription induite par les dommages et la réparation basée sur l'ARN existent, exerçant des fonctions distinctes dans le DDR. La transcription induite par les dommages serait la réponse de signalisation précoce tandis que la réparation basée sur l'ARN agirait en aval comme la NHEJ ou la HR (**Bader et al., 2020**). Seules les investigations futures pourront peut-être fournir cette réponse.

PRESENTATION ET OBJECTIF DE L'ETUDE

1. Contexte de l'étude

Comme nous l'avons vu tout au long de l'introduction, les ARN (codants ou non codants) ainsi que les RBP sont des acteurs importants du processus de maintien de l'intégrité du génome. Ces dernières années, la capacité de liaison directe à l'ARN a été retrouvée pour des protéines pour lesquelles cette caractéristique était inconnue voire insoupçonnée. Dans ce contexte, le laboratoire a recherché l'existence d'une activité de liaison directe à l'ARN au sein des protéines médiatrices de la réponse aux dommages de l'ADN. En particulier, 53BP1, protéine clé de la signalisation des cassures double-brin de l'ADN, a retenu notre attention car :

1.1. 53BP1 possède un domaine putatif de liaison à l'ARN

Les motifs RG (arginine-glycine) et RGG (arginine-glycine-glycine) sont des motifs putatifs de liaison à l'ARN, c'est-à-dire qu'ils sont connus pour lier l'ARN. Le domaine GAR de 53BP1, possédant 3 motifs RG (**Figure 23**), n'a pas de rôle clairement défini. Toutefois, Boisvert et al. ont montré que les arginines présentes dans le domaine GAR sont indispensables pour la liaison de 53BP1 avec l'ADN (simple et double brin) et que leur méthylation par la méthyltransférase PRMT1 régule cette activité (**Boisvert et al., 2005**). Ainsi, la présence d'un domaine GAR dans la séquence protéique de 53BP1 nous permet, en plus des études décrites ultérieurement, de considérer 53BP1 comme un candidat idéal pour l'étude de son interaction directe avec une composante ARN.

1.2. Le recrutement de 53BP1 aux sites de dommages nécessite la présence d'une composante de type ARN

En 2005, Fiona Pryde et ses collaborateurs ont montré l'implication d'une composante ARN dans le recrutement précoce de 53BP1 aux sites de dommage de l'ADN par les radiations ionisantes (Pryde, 2005a). En effet, suite à l'application de radiations ionisantes (IR ; 10 Gy) sur des cellules humaines HeLa ou des fibroblastes embryonnaires de souris NIH3T3, un traitement à la RNase A (une endoribonucléase qui dégrade spécifiquement l'ARN simple brin au niveau des résidus cytosine et uracile) conduit à une diminution significative du nombre de foyers 53BP1. De plus, lorsque 53BP1 est délété de son domaine GAR, il est toujours recruté aux IRIF même si son recrutement est diminué après un traitement à la RNase A uniquement au stade précoce post-IR (20 min après les IR) mais pas aux stades plus tardifs (1h et 2h post-IR). Ceci suggère (i) que la composante ARN serait nécessaire pour l'assemblage des foyers 53BP1 et qu'une fois l'association établie, elle n'est plus nécessaire pour leur maintenance et (ii) que le domaine GAR de 53BP1 faciliterait le ciblage aux IRIF mais qu'il n'est pas absolument nécessaire à son recrutement.

En 2012, l'équipe de Fabrizio d'Adda di Fragagna a montré que l'inhibition de DICER et DROSHA, protéines responsables de la production de petits ARN double-brin dans les cellules, conduit à une réduction significative du nombre de foyers 53BP1 formés rapidement (10 min) après application de radiations ionisantes dans les cellules HeLa. Cette réponse est également observée après un traitement à la RNase A, qui est identique à celle observée dans l'étude précédente. L'équipe conclut que les petits ARN produits en réponse aux dommages de l'ADN (qu'ils nomment DDRNA), originaires du locus endommagé, sont générés par DICER et DROSHA et qu'ils sont responsables de la reformation des foyers 53BP1 lorsque la cellule, déplétée en ARN par un traitement à la RNase, est remise en présence d'ARN (Francia et al., 2012a).

Ainsi, avant le début de mes travaux au laboratoire, seules ces études montraient qu'une composante ARN était nécessaire à la formation des foyers 53BP1 quelques minutes après l'induction de dommages à l'ADN. Cependant, la manière dont 53BP1 interagit, i.e. directement ou indirectement, avec ces ARN dans la cellule pour former des foyers, ne semblait pas connue.

1.3. 53BP1 est par ailleurs une protéine clé du DDR

Chez l'Homme, le gène TP53BP1 (localisé sur le chromosome 15) code pour la protéine 53BP1, décrite pour la première fois il y a plus de vingt ans comme un partenaire de liaison du facteur de transcription p53 (Iwabuchi et al., 1994). Plus tard, les études approfondies sur 53BP1 l'ont rapidement placée en tant qu'acteur central de la signalisation des DSB et de la régulation du choix de leur réparation (NHEJ ou HR) pendant la phase G1 du cycle cellulaire notamment (Chapman et al., 2012; Zimmermann and De Lange, 2014).

53BP1 est une protéine composée de 1972 acide aminés (Figure 23) qui n'a pas d'activité enzymatique mais qui contient des surfaces d'interactions pour de nombreuses protéines du DDR. On retrouve :

- la grande partie N-terminale couvrant plus de la moitié de la protéine. Elle possède 28 motifs SQ/TQ pouvant être phosphorylés par ATM/ATR à la suite d'un dommage à l'ADN. Ces sites de phosphorylation ne sont pas requis pour le recrutement de 53BP1 à la suite d'un dommage mais sont nécessaires à la réparation de l'ADN car ils interagissent entre autres avec les protéines RIF1 et PTIP pour promouvoir la voie de réparation NHEJ et inhiber la HR (Zimmermann and De Lange, 2014).
- la partie centrale de 53BP1 qui permet sa liaison à la chromatine endommagée. Elle comprend le signal de localisation nucléaire (« *nuclear localization sequence* » ou NLS), le double domaine Tudor qui se lie au motif H4K20^{Me2} de la chromatine et un domaine de recrutement dépendant de l'ubiquitine (« *ubiquin-dependent recruitment* » ou UDR) qui reconnaît le motif H2AXK15^{ub} (Botuyan et al., 2006;

Fradet-turcotte et al., 2014). Le domaine d'oligomérisation (« *oligomerization domain* » ou OD) permet l'homodimérisation de 53BP1 en réponse aux dommages de l'ADN. On retrouve également le domaine GAR (décrit plus haut en 1.1).

-la partie C-terminale de 53BP1 qui contient deux domaines BRCT (BRCA1 C-terminus) disposés en tandem qui sont importants pour la réparation de l'ADN dans l'hétérochromatine centromérique.

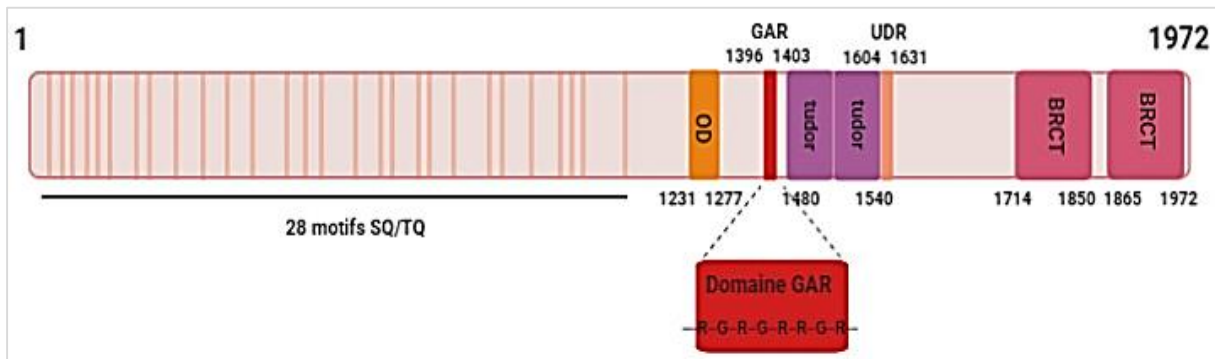


Figure 23 : Les différents domaines protéiques de 53BP1

Ainsi, le rôle de 53BP1 en tant que protéine centrale du DDR (signalisation des DSB et choix entre NHEJ et HR) est largement documentée à ce jour (pour revues **Panier & Boulton, 2014**; **Zimmermann & De Lange, 2014**) même si des zones d'ombres subsistent toujours quant aux rôles précis de certains de ces domaines protéiques tels que le domaine GAR par exemple.

1.4. 53BP1 est aussi présent à la fourche de réplication

On sait que 53BP1 agit spécifiquement en phase G1 du cycle cellulaire pour promouvoir la NHEJ *via* son interaction avec RIF1 empêchant ainsi la résection des extrémités 5' des DSB par les nucléases telles que Exo1 et MRE11 ou encore l'action combinée de BLM et DNA2 (**Nimonkar et al., 2011**). De plus, 53BP1 agit en phase G1 car en phase S/G2, le motif H4K20^{Me2} est moins présent à la chromatine car il est « dilué » après la synthèse de nouveaux nucléosomes s'incorporant à l'ADN répliqué (**Jørgensen et al., 2013**). Mais surtout en phase S/G2, BRCA1 contrecarre l'activité « anti-résection des extrémités d'ADN » de 53BP1 pour empêcher la NHEJ d'avoir lieu et promouvoir la HR (**Bunting et al., 2010**). Cependant, 53BP1 est quand même retrouvée à la fourche de réplication dans certaines conditions. Par exemple, en 2004, il a été montré qu'à la suite d'un traitement HU, 53BP1 colocalise et interagit physiquement avec l'hélicase BLM, dépendamment de la kinase Chk1 et d'ATR, aux fourches de réplication bloquées (**Sengupta et al., 2004**). Par la suite d'autres études ont confirmé le recrutement de 53BP1 aux fourches de réplication bloquées après un traitement de cellules à l'hydroxyurée (Byrum et al., 2019; Dungrawala et al., 2015a; Her et al., 2018). Parmi ces études, les plus récentes indiquent que 53BP1 serait en fait directement impliquée dans la protection des fourches de réplication bloquées en agissant, là aussi, en tant que « limiteur » de la résection de l'ADN, naissant cette fois-ci. En effet, 53BP1

se relocalise à un sous-ensemble de fourches de réplication (par l'intermédiaire des motifs H4K20^{Me2} et H2A-K15-Ub présents) après l'induction d'un stress réplcatif et protège les fourches bloquées en limitant l'accès de la nucléase MRE11 à l'ADN naissant. Une étude similaire a été réalisée chez la levure et révèle également que Rad9 (orthologue de 53BP1 chez l'Homme) est responsable du maintien de la viabilité des cellules défectueuses en Mec1 (orthologue d'ATR, qui phosphoryle 53BP1 et permet le recrutement de RIF1) après un épuisement de dNTP (par un traitement HU) en protégeant les fourches de réplication bloquées de la résection par BLM/DNA2 (Villa et al., 2018).

Ces études montrent finalement que 53BP1 agit en tant que barrière aux nucléases prévenant ainsi la dégradation des fourches de réplication bloquées après induction d'un stress de réplication, ce qui permet à la cellule un redémarrage des fourches normal et une réparation correcte de l'ADN.

2. Objectif de l'étude

Etant donné les études menées sur la protéine 53BP1 et la nécessité d'une composante ARN pour son recrutement aux DSB, l'objectif de ma thèse était de mettre en évidence et de caractériser l'interaction entre 53BP1 et l'ARN.

RESULTATS

1.Choix des approches expérimentales et principaux résultats obtenus

L'objectif de ma thèse était de mettre en évidence et de caractériser l'interaction entre 53BP1 et l'ARN. Dans cette section, le choix des approches pour notre étude est explicité.

Les deux approches *in vivo* couramment utilisées pour analyser les interactions ARN-protéines dans une cellule sont le RIP (« *RNA immunoprecipitation* ») et le CLIP (« *crosslinking immunoprecipitation* »). Le RIP implique l'immunoprécipitation d'une protéine de liaison à l'ARN, ou soupçonnée de lier l'ARN, à l'aide d'un anticorps spécifique de cette protéine. Ainsi, tout ARN lié à celle-ci sera isolé, à condition que l'isolement soit effectué de manière non stringente. Cependant, cette faible stringence se traduit par une faible spécificité de la technique et a conduit au développement du CLIP. Cette technique se distingue du RIP par une étape de couplage covalent (crosslink) aux UV (ANNEXE 1). L'avantage des UV est l'irréversibilité du couplage. Ils « figent » les interactions entre protéines et acides nucléiques en contact direct. Ceci permet l'application ultérieures de conditions stringentes lors des étapes de lavage qui suivent l'immunoprécipitation. Le couplage covalent aux UV est très largement utilisé dans l'étude des complexes ARN-protéines. Cependant, l'ADN, dans une moindre mesure que l'ARN, peut également être couplé de manière covalente aux protéines. Le CLIP permet donc de mettre en évidence une liaison directe entre protéines et acides nucléiques, mais il est toutefois nécessaire de confirmer ensuite la nature de l'acide nucléique de ces derniers.

Des expériences de CLIP nous ont permis de montrer que 53BP1 lie de manière directe des acides nucléiques et ce, dans différents types de lignées cellulaires, à savoir les HeLa, A2058, RPE-1 et U2OS, qui sont souvent utilisées pour étudier la réparation de l'ADN et sa signalisation mais également pour l'étude de la réplication de l'ADN. Les résultats de CLIP sont confirmés par des expériences de 2C (ANNEXE 2). Cette méthode implique l'utilisation d'une matrice de silice, dont la propriété est de retenir fortement et spécifiquement les acides nucléiques et les complexes protéines-acides nucléiques (dont les interactions ont été préalablement « figées » par l'application d'UV-C), en fonction de leur charge. 53BP1, de la même manière que HuR, une RBP bien caractérisée, a été retenue par la matrice de silice, contrairement à la tubuline qui n'est pas connue pour lier l'ARN et qui n'a pas été retenue. Enfin, la sensibilité au traitement à la RNase de l'interaction de 53BP1 avec les acides nucléiques soutient l'hypothèse que 53BP1 est une protéine de liaison aux ARN.

Afin de déterminer la nature des acides nucléiques liés par 53BP1, nous les avons extraits puis purifiés après le CLIP. Ainsi, nous avons observé qu'il s'agit en réalité d'une chimère ARN-ADN qui interagit avec 53BP1. Celle-ci est composée d'environ 20 à 200 nucléotides dont 5-10 ribonucléotides et 15-200 désoxyribonucléotides. Cette entité possède toutes les caractéristiques des fragments d'Okazaki, synthétisés au cours de la réplication de l'ADN.

En parallèle, nous nous sommes intéressés au domaine GAR de 53BP1 qui est impliqué dans la liaison à l'ARN de nombreuses RBP. Afin d'avoir une idée de l'implication de ce domaine dans la liaison de 53BP1 aux acides nucléiques, des protéines de fusion GFP-53BP1 possédant une mutation (3R >3K) dans le domaine GAR ont été transfectées dans des cellules puis des expériences de CLIP ont été entreprises. Ceci nous a permis de montrer que la mutation du domaine GAR de 53BP1 affecte la liaison aux acides nucléiques *in vivo*.

Pour mettre en évidence un lien entre les fragments d'Okazaki et 53BP1, nous avons cherché à perturber leur synthèse pour analyser ensuite les effets sur l'interaction de 53BP1 avec la chimère ARN-ADN. L'émétine, une drogue connue pour inhiber la synthèse des fragments d'Okazaki, n'a pas été utilisée car elle est aussi connue pour inhiber la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines. Perturber dans ses conditions la synthèse des fragments d'Okazaki aurait provoqué trop d'effets sur les cellules. Lors de la réplication de l'ADN, le brin retardé de la fourche de réplication est synthétisé sous forme de fragments d'Okazaki (voir introduction). Ce sont les 2 sous-unité primases (catalytique : PRIM1 et régulatrice : PRIM2) de l'ADN polymérase α qui sont responsables de leur synthèse. Plus particulièrement, c'est PRIM1 qui amorce la synthèse de l'ADN *de novo* en générant une courte matrice d'ARN d'environ 7 nucléotides. Ainsi, inhiber la synthèse des fragments d'Okazaki semblait être un bon moyen de corrélérer la liaison de 53BP1 aux acides nucléiques à sa liaison éventuelle aux fragments d'Okazaki. En effet, la déplétion de PRIM1 montre une diminution de la liaison de 53BP1 aux acides nucléiques. Puisque la synthèse de l'amorce ARN est l'étape initiale de la synthèse d'ADN naissant, nous nous sommes demandés si 53BP1 pouvait se retrouver au niveau de l'ADN nouvellement synthétisé. Un des moyens de le prouver est d'appliquer des techniques dont le principe de base repose sur l'utilisation de l'EdU, un analogue de la thymidine qui s'incorpore à l'ADN en cours de réplication et possédant naturellement un groupement alkyne pouvant être détecté par imagerie ou immunoprécipité facilement par la chimie de Click. Deux méthodes sont alors envisageables, l'IPOND (« *isolation of proteins on nascent DNA* ») et le SIRF (« *in situ Protein Interaction with Nascent DNA Replication Forks* ») (ANNEXE 3). L'IPOND présente les inconvénients de ne pas être résolutif au niveau d'une cellule unique, de ne pas être assez qualitatif et nécessite de grandes quantités de matériel de départ. Le SIRF paraissait la meilleure approche pour répondre à notre question puisqu'elle permet, grâce à l'immunofluorescence, d'être résolutif au niveau d'une cellule unique et de ne pas utiliser beaucoup de matériel de départ. Ainsi grâce au SIRF, nous avons observé une réduction de l'association de 53BP1 avec l'ADN naissant dans les cellules déplétées en PRIM1. Ce résultat va de nouveau dans le sens d'une liaison de 53BP1 aux fragments d'Okazaki. Le repli-CLIP, une technique développée au laboratoire combinant l'incorporation de thymidine tritiée au niveau de l'ADN naissant avec le CLIP, nous a également permis de montrer que la déplétion de PRIM1 induit une diminution de la quantité de

thymidine tritiée associée à 53BP1. Ceci traduit la présence de 53BP1 à proximité de l'ADN naissant. 53BP1 aurait donc un rôle dans la réplication de l'ADN à travers sa liaison aux fragments d'Okazaki.

En partant du principe que 53BP1 pourrait interagir directement avec des fragments d'Okazaki dans un contexte cellulaire non perturbé et compte tenu du fait qu'il a été montré qu'elle avait un rôle de protection des fourches bloquées, nous avons entrepris de traiter les cellules à l'hydroxyurée, une drogue provoquant l'arrêt des fourches de réplication par inhibition de la ribonucléotide réductase. Ainsi, les expériences de SIRF appliquées sur ces cellules nous ont permises de montrer qu'un stress de réplication induit par l'hydroxyurée conduit à l'augmentation de l'association de 53BP1 avec l'ADN naissant.

Tous ces résultats indiquent que 53BP1 interagirait de manière directe avec des fragments d'Okazaki. Cependant, nous ne savons pas dans quelle mesure cette interaction est importante ni dans quel contexte cellulaire elle intervient. Ainsi, je me propose d'émettre des hypothèses pour tenter de répondre à ces questions dans la partie Discussion et Perspectives.

2. Article "53BP1 is an RNA-binding protein that interacts with Okazaki fragments"

53BP1 is an RNA-binding protein that interacts with Okazaki fragments

Mélissa Leriche^{1,2,3}, Jagannath Jana^{1,2,3}, Sabrina Mennour^{1,2,3}, Sylvain Martineau^{1,2,3}, Patricia Uguen^{1,2,3},
Stéphan Vagner^{1,2,3,*}

¹Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR 3348, Orsay, France.

²Université Paris-Saclay, CNRS UMR 3348, Orsay, France.

³Equipe labellisée Ligue contre le Cancer

*Correspondence: stephan.vagner@curie.fr

Keywords: 53BP1, RNA-binding protein, DNA replication, Okazaki fragments

Abstract:

RNA-binding proteins (RBPs) have recently been described to be involved in the maintenance of genome integrity. 53BP1 (P53 binding protein 1), a key protein mediating the signalling of DNA double strand breaks and channels DNA repair to the non-homologous end joining pathway during the G1 phase of the cell cycle to sites of DNA damage, depends on both histones marks and an RNA component. Here we show that 53BP1 directly interacts with RNA by using CLIP (UV-C-induced CrossLinking ImmunoPrecipitation) and 2C (complex capture) experiments in living cells, as well as nucleic acid-protein interaction assays *in vitro*. We identify the nucleic acid interacting with 53BP1 as being an RNA-DNA chimera composed of about 10 ribonucleotides, followed by about 150 dextrinucleotides. This type of entity is similar to Okazaki fragments that are involved in the initiation of lagging strand synthesis at replication forks. We show that the interaction between 53BP1 and RNA-DNA entities is reduced in cells depleted (siRNA) for PRIM1 that catalyses the synthesis of the RNA primer of Okazaki fragments. In addition, depletion of PRIM1 leads to reduced 53BP1 association with nascent DNA as determined by *in situ* analysis of protein interactions at DNA replication forks. Likewise, under replicative stress induced by hydroxyurea, the presence of 53BP1 at the newly synthesized DNA is increased, indicating that 53BP1 accumulates at stalled replication forks. Altogether, these results show that 53BP1 is an RNA-binding protein that directly interacts with Okazaki fragments.

Introduction

Recent observations highlight the importance of RNA binding proteins (RBPs) in genome maintenance. RBPs, through their direct and generally specific binding to *cis*-acting elements in mRNAs, usually act as post-transcriptional regulators of gene expression. Importantly, in addition to their proven role in DNA damage-induced post-transcriptional regulation of DDR (DNA Damage Response) gene expression, RBPs and the RNAs to which they bind may play a more direct role in genome maintenance (Dutertre and Vagner, 2017b; Dutertre et al., 2014; Michelini et al., 2018).

The characterization of RNA-protein interactions *in vivo* mostly consists in applying high doses of UV (254 nm), known to crosslink the naturally photoreactive nucleotide bases, especially pyrimidines, with specific amino acids (Hockensmith et al., 1986), to living cells (Lee and Ule, 2018). UV crosslinking requires direct contact (“zero” distance) between protein and nucleic acids and does not promote protein-protein crosslinking (Greenberg, 1979b)(Pashev et al., 1991; Suchanek et al., 2005). UV irradiation is mainly used to monitor RNA-protein interactions (Lee and Ule, 2018) but it has also been used to establish crosslinks between proteins and single-stranded DNA (ssDNA) (e. g Steen et al., 2001). Using UV-induced crosslinking approaches, more than 1000 proteins have been found interacting with RNAs (Baltz et al., 2012; Castello et al., 2012b; Conrad et al., 2016b; Queiroz et al., 2019b; Trendel et al., 2018). Notably, hundreds of them are novel RNA interactors and lack known RNA-binding domains (RBDs). Apart from RBPs with defined functions in RNA biology, several proteins involved in the DDR have been suggested to be RBPs. However, whether the RNA-binding activity is indeed present in these proteins and is functionally important for genome maintenance/DNA metabolism remains to be evaluated.

It has recently been demonstrated that DDR proteins, in particular 53BP1, are recruited to sites of DNA damage in an RNA-dependent manner (Francia et al., 2012b; Michelini et al., 2017b; Pryde, 2005b). 53BP1 (TP53-binding protein 1), an important regulator of the cellular response to double-strand breaks (DSBs) that promotes non homologous end joining (NHEJ) (Panier and Boulton, 2013), is known to be recruited to sites of DNA damage through the direct recognition of a DSB-specific histone code. This is driven by a signaling cascade that is initiated by the ATM-mediated phosphorylation of the histone 2A (H2A) variant H2A.X (known as γ H2A.X), followed by the recruitment of MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1) and activation of RNF8-RNF168-dependent chromatin ubiquitylation. 53BP1 is then recruited to DSBs via (i) the interaction of its Tudor domain with dimethylated lysine 20 of histone H4 (H4K20me2) and (ii) the interaction of its UDR domain with ubiquitylated H2A. Once recruited to DSBs, 53BP1 acts as a molecular scaffold that recruits additional DSB-responsive proteins to damaged chromatin to inhibit end-resection and promote repair by NHEJ. As stated above, the accumulation of 53BP1 at DSBs has also been shown to be RNA-dependent (Francia 2014, 2017, Michelini 2017, 2019, Pryde 2005). More specifically, sequence specific antisense oligonucleotides against RNAs called damage-induced long non-coding RNAs

(dilncRNAs), transcribed through recruitment of a complete RNA polymerase II (RNAPII) preinitiation complex at DSBs, or RNAPII inhibition caused a disappearance of 53BP1 foci (Michelini et al., 2017b; Pessina et al., 2019). RNA immunoprecipitation (RIP) assays have shown that 53BP1 associates with RNAs (Pryde, 2005b) and that 53BP1 associates with dilncRNAs in a manner dependent on its Tudor domain (Michelini et al., 2017b). These observations however do not demonstrate a direct interaction between 53BP1 and RNA even if a recent report identified 53BP1 as a candidate protein interacting with RNA (Trendel et al., 2018). 53BP1 contains, in between its UDR and Tudor domains, an intrinsically disordered GAR/RGG domain (Glycine-Arginine rich region), that is reported to contribute to direct RNA-binding in some RNA-binding proteins (Thandapani et al., 2013). The GAR domain of 53BP1, comprising 3 repeated RG sequences, also binds to single and double-stranded DNA *in vitro* and is a substrate of the PRMT1 arginine methyl transferase (Boisvert et al., 2014). Strikingly, mutation of the 53BP1 GAR domain does not (Boisvert et al., 2014), or only slightly (Pryde, 2005b), abolishes 53BP1 targeting to DNA damage-induced foci. The GAR mutation only weakly impairs Class Switch Recombination (CSR) (Lottersberger et al., 2013) and only marginally affects the processing of dysfunctional telomeres (which proves to be a versatile system for the rapid dissection of the function of 53BP1 in the context of its ability to promote NHEJ and protect DNA ends from resection) (Lottersberger et al., 2013). Altogether, these data rule out an essential role of the GAR binding domain of 53BP1 in DSB signaling.

In addition to its role in the DNA damage response, 53BP1 plays an important function in DNA replication. 53BP1 has recently been shown to be recruited to stalled replication forks rapidly following a replicative stress induced by hydroxyurea (HU) treatment (Dungrawala et al., 2015b). 53BP1 is also required for efficient accumulation of both BLM and p53 at the sites of stalled replication (Sengupta et al., 2004). Lack of 53BP1 decreases the cell survival and enhanced chromosomal aberration after replication arrest (Tripathi et al., 2007). Finally, 53BP1 protects replication forks during the cellular response to replication stress in primary B cells (Her et al., 2018) and the *S. cerevisiae* 53BP1 ortholog (RAD9) protects stalled replication forks from degradation in Mec1 (ATR) defective cells (Villa et al., 2018). The mechanism of recruitment of 53BP1 to replication forks may not be completely similar to the one existing for 53BP1 recruitment to DSBs since depletion of RNF8, RNF168 or 53BP1, but not MDC1, displays a similar replication defect (*i.e.* delayed fork progression, and reversed fork accumulation) (Schmid et al., 2018). It is therefore not clear which interaction(s) 53BP1 establishes to mediate its functions in DNA replication.

During DNA replication, RNAs are constitutive entities of Okazaki fragments that are RNA-DNA primers produced by the combined action of an RNA polymerase/DNA primase and a DNA polymerase. DNA polymerases are unable to initiate DNA synthesis *de novo* and require an initiating step to generate a primer containing the essential 3' hydroxyl moiety that is a requisite for DNA polymerase-dependent synthesis. This 'priming' role is fulfilled by specialized DNA-dependent RNA polymerases, called DNA primases, capable of synthesizing short RNA chains. Primases are essential,

not only during initiation of DNA replication, but also throughout the process of lagging strand replication, where they initiate synthesis of the discontinuously synthesized Okazaki fragments (Guilliam et al., 2015). Replicative primases typically form a heterodimeric complex containing both a small catalytic subunit (PRIM1) and a large accessory subunit (PRIM2) which itself forms a complex with the error prone DNA polymerase α subunits.

Here, we first intended to examine whether 53BP1 interacts with RNAs. We demonstrate that 53BP1 directly interacts with RNA by using CLIP (UV-C-induced CrossLinking ImmunoPrecipitation) and 2C (Complex Capture) experiments in living cells, as well as nucleic acid-protein interaction assays *in vitro*. We next wanted to determine the types of RNAs to which 53BP1 interacts. By analysing the nature of the nucleic acids bound to 53BP1, we found entities of about 20-200 nucleotides, composed of 5-6 ribonucleotides at the 5' end followed by 15-200 desoxyribonucleotides at the 3' end interacts with 53BP1, that resemble Okazaki fragments. According with the hypothesis that 53BP1 directly interacts with Okazaki fragments; we show that the interaction between 53BP1 and RNA-DNA entities is reduced in cells depleted (siRNA) for PRIM1. In addition, depletion of PRIM1 leads to reduced 53BP1 association with nascent DNA (as determined by *in situ* analysis of protein interactions at DNA replication forks (SIRF; (Roy et al., 2018))). Consistent with a role of the interaction between 53BP1 and nascent DNA in the recruitment of 53BP1 to stalled replication forks rapidly following HU treatment, we observed an increased association of 53BP1 with nascent DNA in HU-treated cells. Altogether, these results indicate that the interaction between 53BP1 and Okazaki fragments is a key determinant of the functions of 53BP1 in DNA replication.

Results and Discussion

53BP1 is an RNA-binding protein

The ability of 53BP1 to directly bind to nucleic acids *in vivo* was analyzed following irradiation of HEK293 cells with high doses of UV in a CLIP (CrossLinking ImmunoPrecipitation) experiment (Fig. 1A). An siRNA directed against 53BP1 was used to ascertain that the band migrating at the size of 53BP1 on an SDS-PAGE gel corresponded to 53BP1 (Fig. 1B). Following immunoprecipitation of 53BP1 and stringent washes, the immunoprecipitate (IP) was radiolabeled with T4 polynucleotide kinase (PNK) and $\gamma^{32}\text{P}$ ATP, subjected to SDS-PAGE, transferred to a membrane and detected by either autoradiography or western blot. We observed a sharp radioactive band at the size of 53BP1 in the UV-irradiated sample indicating a direct interaction of 53BP1 with a ^{32}P 5'-end labeled nucleic acid (Fig. 1C). This band was only weakly present when the procedure was performed with non-UV exposed cells (Fig. 1C), even if 53BP1 was present in the IP (Fig. 1D, left lane). In addition to the strong band migrating at the size of 53BP1, we observed a weaker faster migrating band (Fig. 1C, labelled *). The intensity of the upper band was reduced in 53BP1-depleted cells while the intensity of lower band did not change, both in the radioactive gel (Fig. 1C) and in the western blot of the 53BP1 IP (Fig. 1D). The lower migrating band therefore corresponds to an unknown protein that is present in the 53BP1 IP and that interacts with nucleic acids. Altogether, these results indicate that the endogenous 53BP1 in HEK 293 cells interacts directly with nucleic acids.

We observed very similar results in other cell lines, including the HeLa cervical cancer cells, the A2058 melanoma cells, the RPE-1 non-transformed human epithelial cells and the U2OS osteosarcoma cells that have been widely used in the analysis of DNA repair and signaling. In all these cell lines, the presence of a radioactive signal corresponding to the size of 53BP1 in UV-treated cells that was partly absent in non-UV treated cells and that strongly disappeared in 53BP1-depleted cells (Fig. 1E) showed that 53BP1 directly interacts with nucleic acids in the five tested cell lines.

The nucleic acids to which 53BP1 interacts are likely to be RNAs. Indeed, the efficiency of UV-induced DNA-protein crosslinking is much lower than for RNA-protein crosslinking. To nevertheless further demonstrate that 53BP1 is an RNA-binding protein, we performed complex capture (2C) experiments that use the property of silica matrices to strongly and specifically retain nucleic acids and crosslinked nucleic acid-protein complexes based on charge (Fig. 2A) (Asencio et al., 2018). 53BP1, similarly to the well-characterized RNA-binding protein HuR, was retained on the silica matrix in a UV-dependent manner (Fig. 2B). Tubulin, a protein that is not expected to bind RNAs, was not retained on the column (Fig. 2B). Sensitivity of the signal to RNase treatment prior to loading on the column (Fig. 2B) supports the conclusion that 53BP1 is an RNA binding protein. A GFP fusion protein containing the carboxy-terminal half of 53BP1, but not tubulin or H3, was also retained on the silica matrix in a

UV-dependent manner (Fig. 2C). Here again, there was no retention following RNase treatment (Fig. 2C) demonstrating that 53BP1 is an RNA-binding protein and that one or several RNA binding domain(s) should be present in the carboxy-terminal half of the protein

To further determine if 53BP1 binds to RNA, we employed electrophoretic mobility shift assay (EMSA). We produced in *E. Coli* and purified a fragment of 53BP1 containing the GAR and the Tudor domains (1288–1659) (GARwt-Tudor) as well as its counterpart with 3 mutations (R to K) in the GAR domain (GARmut-Tudor) (data not shown). We incubated increasing concentrations of the purified proteins with a 5'-end fluorescently labelled synthetic 35 nts-long RNA called SC1 that interacts with the Fragile X Mental Retardation protein (FMRP) that uses a GAR motif for specific interactions with RNA (Vasilyev et al., 2015). The migration of the SC1 RNA was shifted in the presence of the GARwt-Tudor protein in a dose-dependent manner (Fig. 2D), showing a direct binding. This interaction was specific since the GARmut-Tudor protein did not induce a retarded migration (Fig. 2D). Surface Plasmon Resonance (SPR) experiments with the same recombinant proteins, but with a 5'-end biotinylated SC1 RNA indicated that the GARwt-Tudor fragment interacts with the SC1 RNA with an affinity of about 8 nM (Fig. 2E and 2F) while the GARmut-Tudor was unable to interact (Fig. 2E).

The carboxy-terminal half of 53BP1 interacts with RNA but is recruited to DNA damage in an RNA-independent manner

To determine if the region of 53BP1 essential for targeting to IR-induced foci (IRIF) also binds to RNA, we expressed a GFP-53BP1 fusion protein (Fig. 3A) containing the carboxy-terminal half of 53BP1 (Fig. 3A) in HEK-293 cells and performed the CLIP procedure with a GFP antibody. We observed a major sharp radioactive band for the GFP-53BP1-Cter protein at a position corresponding to its predicted size (Fig. 3B). The radioactive signal was weaker without UV-crosslinking even if 53BP1 was present in the IP (Fig. 3B). The same result was found with the full-length protein (GFP-53BP1) but not the GFP protein alone. These data (i) confirm the results presented in figure 1 showing that 53BP1 interact with nucleic acids *in vivo* by using GFP antibodies instead of 53BP1 antibodies and (ii) indicate that an RNA-binding activity can be found in the carboxy-terminal half of 53BP1.

To ascertain that the GFP-53BP1 fusion constructs are functional, we analyzed the recruitment of the proteins to IR-induced damaged DNA. Using fluorescence microscopy, we found that both the GFP-53BP1 and GFP-53BP1-Cter proteins are recruited to IR-induced damaged DNA following either a whole 10 Gy irradiation or a laser micro-irradiation that creates localized tracks (in the form of stripes) of DNA damage in U2OS cells (Fig. 3C). We found that GFP-53BP1, but not GFP-53BP1-Cter recruitment to DNA damage was reduced in cells permeabilized and treated with RNase A. This shows, as already described, that the recruitment of the full length 53BP1 to DNA damage foci is indeed RNA dependent (Francia et al., 2012b; Pryde, 2005b), but that the recruitment of a fragment of 53BP1

containing the minimal IRIF domain to DNA damage is RNA-independent (Pryde, 2005b). The region of 53BP1 that contains an RNA-binding activity RNA is recruited to DNA damage in an RNA-independent manner ruling out a role for direct binding to RNA in the recruitment of 53BP1 to DNA damage sites.

53BP1 interacts with RNA-DNA chimeric entities

To analyse the nature of the nucleic acids bound to 53BP1, we extracted nucleic acids from the ³²P-labelled crosslinked nucleic acid-protein complexes, loaded the extracted nucleic acids on a denaturing TBE-Urea gel and revealed the radioactive signal by autoradiography (Fig. 4A). We found that entities migrating as a smear of about 20-150 nucleotides were extracted from the 53BP1-nucleic acid complex (Fig. 4B). The smear disappeared following RNase A (an endoribonuclease that cleaves single-stranded RNAs specifically on the 3' side of pyrimidine residues) treatment (Fig. 4B) showing that these entities possess ribonucleotides at their 5' ends. The same was true when the CLIP procedure was performed with the well-characterized RBMX RNA binding protein (Fig. 4C). Strikingly, the size of the smear was strongly reduced following treatment with RNase free-DNAse I in the case of the GFP-53BP1 CLIP (Fig. 4B), but not in the case of the GFP-RBMX CLIP (Fig. 4C). This shows that the DNAse I we used was indeed RNase-free. The shorter smear disappeared following treatment with both DNAse I and RNase A (Fig. 4B) showing that it was composed of 5'-end labelled RNAs of different sizes (between 5 and 20 nts). The same results were obtained when the CLIP procedure was performed with the endogenous 53BP1 (Fig. 4D). This indicates that the nucleic acids entities interacting with 53BP1 contain ribonucleotides (up to 20 nts) at their 5' ends followed by deoxyribonucleotides (up to 150 nts) at their 3' ends. 53BP1 therefore interacts with RNA-DNA chimeric entities.

53BP1 interacts with Okazaki fragments

As discussed in the introduction, Okazaki fragments are RNA-DNA chimeric entities synthesized during DNA replication. To determine if the RNA-DNA chimeric entities bound to 53BP1 are produced during DNA replication, we developed a procedure, that we called Repli-CLIP, in which we pulse-labelled living cells with ³H-thymidine before performing the CLIP experiments (Fig. 5A). The incorporation of ³H-thymidine in 53BP1 IP was measured by liquid scintillation counting. In a time course experiment, ³H-thymidine was found in the 53BP1 IP, but not in the control IgG beads or the empty beads (Fig. 5B), showing that 53BP1 interacts with nascent DNA.

As an additional evidence that 53BP1 interacts with Okazaki fragments, we first analyzed the interaction between 53BP1 and nascent DNA in cells depleted of PRIM1, the catalytic subunit of primase that synthesizes the RNA moiety of the Okazaki fragments. In the Repli-CLIP assay, depletion

of PRIM1 (and 53BP1 used as a control) led to reduced incorporation of ^3H -thymidine in 53BP1 IP (Fig. 6A) showing that 53BP1 interaction with nascent DNA depends on the presence of Okazaki fragments.

We next used an *in situ* analysis of protein interactions at DNA replication forks (SIRF) technology (Roy et al., 2018) that allows for the quantitative assessment of protein interactions with ongoing, stalled, and previously active replication forks using a Proximity Ligation Assay (PLA) technology. Cells are pulse-labeled with the nucleotide analogue EdU, an alkyne group containing thymidine analogue that is incorporated into newly synthesized DNA and marks sites of nascent DNA. Briefly, after cell permeabilization, click chemistry between the alkyne group of EdU and a biotin-azide allows the biotinylation of the EdU-incorporated DNA. Cells are subsequently incubated with primary antibodies against biotin and the protein of interest, in that case 53BP1 and the DNA polymerase processivity factor proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a control, before applying the PLA procedure. Consistent with previous observations (Roy et al., 2018), 53BP1 and PCNA are associated with EdU-labeled DNA (Fig. 6B and 6C). Depletion of PRIM1 (and 53BP1 used as a control) reduced the association of 53BP1 to EdU-labeled DNA. Importantly, these observations are made in conditions in which the decreased signal is not a result of decreased EdU incorporation. In addition, in contrast to PCNA, 53BP1 associations with EdU-labeled DNA increased with thymidine chase (Fig. 6B and 6C). These data suggest that 53BP1 association with nascent DNA depends on the presence of intact Okazaki fragments and that 53BP1 does not travel with the replication fork but accumulates after the replisome has moved past the region of DNA.

We finally used CLIP experiments (Fig. 6D) to examine 53BP1-RNA interactions in PRIM1-depleted cells (Fig. 6D). The non-specific band (*) served as a loading control to quantify the amount of RNA-bound 53BP1 by calculating the ratio of the intensity of the band corresponding to 53BP1 over the intensity of the band corresponding to the non-specific interaction. Depletion of 53BP1 or PRIM1 reduced the 53BP1 CLIP signal by 40 % and 20 %, respectively (Fig. 6D). Altogether, these data show that perturbation of Okazaki fragment synthesis through depletion of PRIM1 leads to reduced interaction between 53BP1 and nascent DNA, showing that 53BP1 interacts with Okazaki fragments.

As a final indication that the interaction between 53BP1 and nascent DNA/RNA is linked to DNA replication, we performed the SIRF experiments in cells treated with hydroxyurea (HU) that is used here to study protein association with stalled replication forks. We observed an increase in the assembly of 53BP1 with nascent DNA following HU treatment (Fig. 7A and 7B). This shows that blocking the replication process leads to accumulation of 53BP1 at replication forks. Since a large body of evidence indicates that reversed forks are used as an entry point for exonucleases involved in fork resection (Pasero & Vindigni, 2017), and since 53BP1 prevents resection at DNA ends, an attractive possibility could be that this protein binds Okazaki fragments at reversed forks to control resection.

This novel role of 53BP1 in replication stress response and genome maintenance might be of prime importance in human health. Strong evidence supports that replication stress is a major driver of tumor progression. From a therapeutic point of view, it is important to determine how various factors can limit the deleterious effects of a perturbed replication program. Several studies have indicated that TP53BP1 mutation might be associated with cancer risk. A pioneer work has found that TP53BP1 variants may have protective effects on squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) risk (Chen et al., 2007). Recent genome-wide association studies (GWASs) have identified that common genetic variants at 15q15.2 locus containing the TP53BP1 gene have been associated with lung cancer risk (Rafnar et al., 2011; Timofeeva et al., 2012). Hence, the evaluation of the 53BP1 mutations should be extended, beyond their effects on DSBs signaling, to replication defects.

Materials and Methods

Cell culture

Cells were grown in a 5% CO₂ humidified incubator at 37°C. U2OS cells, RPE1 cells, HeLa cells and HEK293 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine. A2058 were grown in MEM supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine.

siRNA transfections

siRNA transfections were performed with Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. In brief, transfections were performed in 14 cm dishes containing 40% confluent cells, in 17 ml DMEM or MEM, 10% FBS, and 2 mM L-glutamine to which 4 ml of the transfection mix in Opti-MEM (Life Technologies) were added to a final concentration of 25 or 30 nM pool of siRNA (Dharmacon) in the medium. Optimal depletion was obtained 72 hours post-transfection for PRIM1 and 48 hours for 53BP1.

- Target sequences siRNA 53BP1 (SMART pool) from Dharmacon:

-GAAGGACGGAGUACUAAUA

-GCUAUAUCCUUGAAGAUUU

-GAGCUGGGAAGUAUAAAUA

-GGACUCCAGUGUUGUCAUU

- Target sequences siRNA PRIM1 (SMART pool) from Dharmacon:

-GCAAAGGAAUCAUCAUCU

-GUUCUGGGAUAGUUGAGUA

-GAGGAGAUGUUGUAGUUCU

-UCUAGCACCUUAUGUGAAA

Plasmid transfections

Plasmid transfections were performed using Jet PEI (Polyplus Transfection) according to manufacturer's instructions. In brief, transfections were performed in 14 cm dishes containing 40% confluent HEK293 cells in 17 ml DMEM, 5% FBS, and 2 mM L-glutamine to which 2 ml of the transfection mix of 150 mM NaCl containing 3 to 10 µg plasmid with 6 to 20 µl Jet PEI, were added. Plasmid GFP-53BP1 is a gift from CEA. Plasmid GFP-53BP1-Cter corresponds to pcDNA 6.2 (Vivid Colors™ pcDNA™6.2/N-EmGFP-GW/TOPO™ Mammalian Expression Vector, Thermofisher) in which 53BP1 sequence deleted from 1 to 1234 amino acids has been inserted. Plasmid GFP-RBMX corresponds to RBMX sequence inserted in pcDNA 6.2.

Chemicals

For SIRF experiments, after EdU treatment, U2OS cells were treated with 0.5 mM Hydroxyurea for 4 hours.

Antibodies

A list of antibodies with details and dilutions is provided in Table 1.

Table 1: list of antibodies used in the experiments.

Target	Mono/polyclonal	Reference	Antibody raised in	Source	Dilution	Type of experiment
53BP1	Polyclonal	A300-272A	Rabbit	Bethyl	1 µg/10 µl	CLIP
GFP	Monoclonal	1181446001	Mouse	Roche	1 µg/10 µl	
53BP1	Polyclonal	A300-272A	Rabbit	Bethyl	1/30,000	2C
GFP	Monoclonal	1181446001	Mouse	Roche	1/5,000	
Tubul	Monoclonal	GTX628802	Mouse	GeneTex	1/5,000	
HuR	Monoclonal	Sc-5261	Mouse	Santa Cruz	1/2,000	
53BP1	Monoclonal	MAB3802	Mouse	Millipore	1/1,000	SIRF
Biotin	Polyclonal	A150-109A	Rabbit	Bethyl	1/4,000	
PCNA	Monoclonal	Sc-56	Mouse	Santa Cruz	1/500	
53BP1	Polyclonal	Sc-22760	Rabbit	Santa Cruz	1/2,000	IF
γH2A	Monoclonal	Ab26350	Mouse	Abcam	1/2,000	

Cell lysis

Total cell extracts were prepared by scraping cells in PBS and lysed for 1h in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate) for CLIP experiments or in HMGN150 buffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.5% Nonidet P-40) for 2C experiments. Lysis buffers were complemented with protease inhibitor cocktail (Roche) before adding to the cell pellet. Protein concentration was estimated by BCA method (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, USA) using the BCA Protein Assay Kit (Thermofisher).

Immunofluorescence (IF)

U2OS were seeded on 160-µm-thick coverslips 48 hours before experiments. After DNA damage induction, cells were washed with cold PBS, pre-extracted with cold CSK (10 mM PIPES, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, protease inhibitor cocktail), permeabilized with cold CSK-T buffer (10 mM PIPES, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 2% Triton X-100, protease inhibitor cocktail) during 5 minutes. Before fixing, an RNase A treatment at 1mg/ml (when specified) was performed (in PBS) during 10 minutes, at 37°C. Cells were then fixed with 2% PFA for 20 minutes at room temperature. Before staining, cells were washed with PBS/0.1% Tween 20 (PBS-T) and blocked with PBS-T containing 5% BSA. Coverslips were incubated for 1 hour with primary antibody (γH2AX

and 53BP1) in PBS-T/5% BSA and then washed with PBS-T and incubated with appropriate goat secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488 or 594 (Life technologies) for 1 hour in PBS-T/5% BSA. After washes with PBS-T and PBS, coverslips were mounted on glass using ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies).

DNA damage induction before IF

10 Gy irradiation: Cultured living U2OS were irradiated with a Cesium 137 irradiator (GSR D1) with 10 Gy.

Micro-irradiation: the confocal microscope TCS SP5 Leica allowed DNA damage induction in cultured living U2OS cells using laser at 405 nm.

Crosslinking and immunoprecipitation (CLIP)

Cells were irradiated with UV-C light at 254nm, lysed in RIPA buffer and immunoprecipitated with Dynabead Protein G (Thermofisher) using 5 µg of rabbit anti-53BP1 or 5 µg of mouse anti-GFP antibodies for each condition. Immunocomplexes were washed twice with RIPA-S buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate) and once with PNK buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2% Tween 20). Then, crosslinked nucleic acids were radiolabelled using ATP, [γ -³²P] (PerkinElmer) and T4 polynucleotide kinase (Thermofisher) with the buffer B (forward reaction), washed once with RIPA-S buffer and one time with PNK buffer. Elution of immunocomplexes was performed using LDS 1X buffer (LDS 4X and reducing agent 10X (Thermofisher) in PNK buffer)). Protein-RNA complexes were separated by SDS-PAGE, then the gel was dried and complexes were visualized by exposure to a phosphoimager screen. In the case where nucleic acids were extracted, RNA-proteins complexes were transferred onto nitrocellulose membrane 0.45 µm and complexes were visualized by exposure to a phosphoimager screen. The nitrocellulose membrane was cut out at the suspected molecular weight of the radiolabelled protein of interest. Nitrocellulose pieces were treated with proteinase K (1 mg/ml) in 200 µl of PK buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA), once without urea and then once with urea 7M. Nucleic acids were purified with one volume (400 µl) of phenol/choloform/isoamyl alcohol 25:24:1 (Sigma) and then precipitated by adding Glycoblue, sodium acetate and 100% ethanol overnight. After centrifugation and washes (80% ethanol), nucleic acids pellet was resuspended in water and divided into three conditions. One condition without treatment, one with RNase A treatment (1 µl at 10 mg/ml) and one with DNase treatment (1µl at 2U/µl). Nucleic acids were separated using denaturing polyacrylamide gel (TBE-Urea gel, 6%, Thermofisher). The gel was dried and nucleic acids were visualized by exposure to a phosphoimager screen.

Repli-CLIP

Cells were incubated for proper time in the presence of $2\mu\text{Ci/ml}$ of methyl- ^3H thymidine (Perkin Elmer). The medium is replaced by fresh one and cells were incubated for 20 minutes. Then the CLIP procedure is performed without the step of radiolabelling by ATP, [γ - ^{32}P] of nucleic acids. After elution, the immunoprecipitate is transferred into a scintillation vial for measurement. In parallel, a fraction (10%) of the input and of the eluate is loaded on a SDS-PAGE to control the amount of 53BP1.

SIRF (from Roy et al. 2018)

U2OS were seeded on Millicell EZ SLIDE 8-well glass 48h before experiment and then incubated with $25\mu\text{M}$ EdU for 8 minutes. After treatment, cells were washed with cold PBS, pre-extracted with cold CSK (10 mM PIPES, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl_2 , protease inhibitor cocktail), permeabilized with cold CSK-T buffer (10 mM PIPES, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl_2 , 2% Triton X-100, protease inhibitor cocktail) during 5 minutes and then fixed with 4% PFA in PBS for 20 minutes at room temperature. For conditions with thymidine chases, EdU was removed and slides were washed twice with PBS before addition of media with thymidine ($100\mu\text{M}$ for 4 hours). After fixation, PFA was discarded, chambers were removed from slides and washed in Coplin jars filled with PBS (50 ml) twice for 5 minutes. Slides were placed in a humid chamber, and click reaction cocktail (10 μM biotin azide, 100 μM sodium ascorbate, 2 mM CuSO_4 , 1 μM Alexa Fluor 488 Azide, in PBS in this order) was added to the slides (25 $\mu\text{l/well}$) and incubated at room temperature for 1 hour. After the click reaction, slides were washed in a Coplin jar containing PBS for 5 minutes. Slides were placed back in the humid chamber and blocked with blocking buffer (10% goat serum and 0.1% Triton X-100 in PBS) for 1 hour at room temperature. Primary antibodies (anti-53BP1, anti-biotin, anti-PCNA and anti-H1) were diluted in blocking buffer, dispensed onto slides (30 $\mu\text{l/well}$), and incubated at 4°C overnight in a humid chamber. Slides were washed three times with wash buffer A (0.01 M Tris, 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween 20, pH 7.4) for 5 minutes. Duolink In Situ PLA probes (Sigma) anti-mouse plus and anti-rabbit minus were diluted 1:5 in blocking solution dispensed onto slides and incubated for 1 hour at 37°C . Slides were again washed with wash buffer A three times for 5 minutes. Ligation mix was prepared by diluting Duolink ligation stock (1:5) and ligase (1:40) in high-purity water. Slides were placed back in the humid chamber, and ligation mix was dispensed onto slides and incubated at 37°C for 30 minutes. Slides were washed with wash buffer A two times for 2 minutes. Amplification mix was prepared by diluting Duolink amplification stock (1:5) and polymerase (1:80) in high-purity water. Slides were placed back in the humid chamber, and amplification mix was dispensed onto slides (30 $\mu\text{l/well}$) and incubated at 37°C for 100 minutes maximum. Slides were washed with wash buffer B solution (0.2 M Tris and 0.1 M NaCl) three times for 10 minutes and once in $0.01\times$ diluted wash buffer B solution for 1 minute. One drop of ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen) was added to each well to mount slides with glass coverslips (1.5 mm). Slides were imaged using Leica 3D

upright deconvolution microscope with a CoolSNAP HQ camera and analyzed using a semi-automatic macro on Fiji software.

SDS-PAGE and Western blotting

Cells were harvested into ice-cold PBS and centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes at 4°C. The cell pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Roche) and a cocktail of phosphatase inhibitors (ThermoFisher). Protein concentration was estimated by BCA method. LDS 1X and reducing agent 1X were added to lysates before separation in polyacrylamide gels by SDS-PAGE. The same protein amount was loaded into each well. Proteins were then electrotransferred onto nitrocellulose membrane (0.45 µm) using dry blotting system and detected by specific primary antibodies. After washing the membrane, the secondary antibodies (HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG) were used. Proteins were detected by ECL (Bio-Rad Laboratories). GAPDH and vinculin were used as a marker of equal loading. ImageLab software was used for contrast adjustment of images.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA):

Appropriate concentrations of each protein and trace amount (25 nM) of ATTO700 labeled oligonucleotides were incubated with binding buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.1 mM DTT, 5% glycerol, 0.01 mg/ml BSA, pH 7.5) in a 20 µl final reaction volume at room temperature for 45 min. The incubated samples were loaded on an 8% polyacrylamide (37.5:1acrylamide/bis-acrylamide) non-denaturing gel. Native polyacrylamide gel electrophoresis was run at 120 volt for 4 hours at room temperature in 0.5X TBE buffer. Gels were imaged using an Odyssey scanner.

Surface Plasmon Resonance (SPR):

The interaction between nucleic acids (ligands) and the proteins (analytes) were measured by the surface plasmon resonance (SPR) technique using a ProteOn XPR36™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). NLC Sensor chips precoated with NeutrAvidin (Bio-Rad Laboratories) were conditioned with 30-µl injections of 50 mM NaOH and 1.0 M NaCl at a flow rate of 30 µl/min in both ligand and analyte flow directions. Immobilization was performed in the running buffer containing 10 mM Tris-HCl, 200 mM KCl at pH 7.5 Tris-HCl. 0.01% v/v tween were added in the buffer. The temperature of the chip surface was maintained at 25 °C. The all biotinylated oligonucleotides were immobilized one by one onto a single channel of the six channel NLC sensor chip. Each oligonucleotide construct was immobilized onto an individual ligand channel by flowing the constructs at a concentration of 10 to 40 nM for 60 to 240 sec injection. Binding to the chip surface resulted in approximately 60-100 response units (RU). The chip was rotated to the analyte flow direction and stabilized by flowing 60 µl analyte EMSA buffer three or more times, as required. Analyte (purified protein or buffer) was applied at various concentrations through the analyte channels at 100 µl/min for an association phase of 150 s, followed

by a dissociation phase (running buffer only) of 600 s. The surface was regenerated with 18 μl of 0.5% SDS, at a flow rate of 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ followed by flowing 60 μl running buffer in the analyte direction at 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. The resultant sensorgrams for each analyte interaction were analyzed with ProteOn software (Bio-Rad Laboratories). Kinetic parameters for first the dissociation constant (k_d) and then the association constant (k_a) were estimated by fitting the kinetic data according to the 1 : 1 Langmuir model and values of KD were then calculated (using the ratio k_d/k_a).

Figure legends

Figure 1. Endogenous 53BP1 interacts with nucleic acids. (A) Schematic representation of the CLIP procedure. WB: western blot; IP: immunoprecipitation. PNK: polynucleotide kinase (B) Western blot of 53BP1 and GAPDH (used as a normalization control) in UV-C treated (+) or mock-treated (-) HEK-293 cells depleted (siRNA) or not (ctrl) of 53BP1. (C) Autoradiography. Same conditions as in (B). (D) Western blot of the immunoprecipitates. Same conditions as in (B). (E) Autoradiography in different cell lines (Hela, A2058, RPE1, U2OS). Asterisk indicates a non-specific band (*), arrow indicates 53BP1 band.

Figure 2. 53BP1 directly interacts with RNA. (A) Schematic representation of the 2C procedure. (B) Western blot using antibodies directed against 53BP1, the well characterize RNA-binding protein HuR was used as a positive control and H3 or tubulin as negative control for RNA binding. 2C was performed in A2058 cells. (C) Western blot on 2C experiments performed on extracts of GFP-53BP1-Cter (corresponding to the carboxy-terminal half of 53BP1 including the GAR and Tudor domain) in transfected HEK 293 cells. (D) Electromobility shift assay (EMSA) was performed using purified recombinant 53BP1 containing the Tudor and the GAR domains (1288-1659) with (GARmut-Tudor) or without (GARwt-Tudor) 3 mutations (R to K) in the GAR domain. Increased concentrations of these purified proteins were incubated with a 5'-end fluorescently labelled synthetic 35 nts-long SC1 RNA. (E) Surface plasmon resonance (SPR) experiments with the indicated recombinant proteins and a 5'-end biotinylated SC1 RNA. (F) Binding affinities of the GARwt-Tudor protein for the SC1 RNA as determined by SPR in (E).

Figure 3. The C-terminal part of 53BP1 harbours an RNA binding activity but is recruited to DNA damage in an RNA-independent manner. (A) Schematic diagram of the two GFP-53BP1 constructs used for transient expression in HEK 293 cells (B) or U2OS cells (C). The blue square represents the GAR domain. (B) CLIP experiments performed in HEK 293 cells transfected with the plasmids expressing the two GFP-53BP1 proteins presented in (A) or GFP alone (upper panel). 10% of the IP was analysed by western blot to confirm immunoprecipitation (lower panel). (C) Immunofluorescence was performed in U2OS cells expressing the two GFP-53BP1 proteins presented in (A). The cells were either irradiated with 10 Gy X-ray (whole cell) or with laser micro irradiation at 405 nm (stripes), treated with or without (Mock) RNase A, fixed and stained with anti- γ H2AX (red) or GFP (green) antibodies and observed under a fluorescent microscope.

Figure 4. 53BP1 binds an RNA-DNA chimera. (A) Schematic protocol of nucleic acid extraction procedure following CLIP. After separation of the radiolabelled protein-RNA complexes by SDS-PAGE and its transfer on a nitrocellulose membrane, the portion of the nitrocellulose membrane corresponding

to the molecular weight of 53BP1 (green asterisk) was excised. Nucleic acids were then extracted, purified and precipitated. The eluted nucleic acids were then treated with turbo DNase I or RNase A before loading onto denaturing TBE-Urea gel. **(B)** CLIP (left panel) and nucleic acid extraction (right panel) of GFP-53BP1 expressed in HEK 293. **(C)** CLIP (left panel) and nucleic acid extraction (right panel) of GFP-RBMX expressed in HEK 293. **(D)** CLIP (left panel) and nucleic acid extraction (right panel) of endogenous 53BP1 in A2058.

Figure 5. 53BP1 interacts with nascent DNA. **(A)** Schematic procedure of the Repli-CLIP method. A2058 cells were pulse-labelled with methyl ^3H -thymidine before performing the CLIP experiments. The incorporation of methyl ^3H -thymidine in 53BP1 immunoprecipitates was measured by liquid scintillation counting. **(B)** Graph representing ^3H -thymidine incorporation in UV-treated cells compared to mock-treated cells in 53BP1 IP or in control beads (empty or IgG) after 30, 60 and 90 minutes of pulse-labelling.

Figure 6. Depletion of PRIM1 decreases 53BP1 interaction with Okazaki fragments. **(A)** Repli-CLIP. Graph representing ^3H -thymidine incorporation in UV-treated cells compared to mock-treated cells in 53BP1 IP after 60 minutes of pulse-labelling of untransfected A2058 cells (mock) or of cells depleted (siRNA) of 53BP1 or PRIM1. **(B)** Representative images of untransfected U2OS cells (Mock) or of cells depleted (siRNA) of 53BP1 or PRIM1 cells with 53BP1-EdU and PCNA-EdU PLA signals (red), Alexa Fluor 488-EdU staining (green), and DAPI staining (blue). **(C)** Scatter plot of 53BP1-EdU PLA dots corresponding to **(B)**. The significance for 53BP1-EdU values was derived from the Mann-Whitney statistical test. Bars represent the mean (numbers above) and SD of combined data from repeated experiments **** $p < 0.0001$. **(D)** Detection of the radiolabelled 53BP1-RNA complexes (CLIP) in untransfected A2058 cells (Mock) or cells depleted (siRNA) of 53BP1 or PRIM1. The asterisk corresponding to a non-specific unknown protein (lower band) in 53BP1 IP and is used as a loading control to quantify the amount of RNA-bound 53BP1.

Figure 7. 53BP1 binds to stalled replication fork. **(A)** Representative images of 53BP1-EdU PLA signals in HU- (0.5 mM for 4 h) or mock-treated U2OS cells. **(B)** Scatter plot of 53BP1-EdU signals corresponding to **(A)**. The significance for 53BP1-EdU values was derived from the Mann-Whitney statistical test. Bars represent the mean (numbers above) and SD of combined data from repeated experiments **** $p < 0.0001$

References

- Asencio, C., Chatterjee, A., and Hentze, M.W. (2018). Silica-based solid-phase extraction of cross-linked nucleic acid-bound proteins. *Life Sci. Alliance* *1*, 1–8.
- Baltz, A.G., Munschauer, M., Schwanhäusser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M., et al. (2012). The mRNA-Bound Proteome and Its Global Occupancy Profile on Protein-Coding Transcripts. *Mol. Cell* *46*, 674–690.
- Boisvert, F.-M., Rhie, A., Richard, S., and Doherty, A.J. (2014). The GAR Motif of 53BP1 is Arginine Methylated by PRMT1 and is Necessary for 53BP1 DNA Binding Activity. *Cell Cycle* *4*, 1834–1841.
- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B.M., Strein, C., Davey, N.E., Humphreys, D.T., Preiss, T., Steinmetz, L.M., et al. (2012). Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell* *149*, 1393–1406.
- Conrad, T., Albrecht, A.-S., de Melo Costa, V.R., Sauer, S., Meierhofer, D., and Rom, U.A.O. (2016). Serial interactome capture of the human cell nucleus. *Nat. Commun.* *7*, 1–11.
- Dungrawala, H., Rose, K.L., Bhat, K.P., Mohni, K.N., Glick, G.G., Couch, F.B., and Cortez, D. (2015). The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability. *Mol. Cell* *59*, 998–1010.
- Dutertre, M., and Vagner, S. (2017). DNA-Damage Response RNA-Binding Proteins (DDRBP): Perspectives from a New Class of Proteins and Their RNA Targets. *J. Mol. Biol.* *429*.
- Dutertre, M., Lambert, S., Carreira, A., Amor-Gu eret, M., and Vagner, S. (2014). DNA damage: RNA-binding proteins protect from near and far. *Trends Biochem. Sci.* *39*.
- Francia, S., Michelini, F., Saxena, A., Tang, D., de Hoon, M., Anelli, V., Mione, M., Carninci, P., and d’Adda di Fagagna, F. (2012). Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature* *488*, 231–235.
- Greenberg, J.R. (1979). Ultraviolet Light-Induced Crosslinking of mRNA to Proteins. *Nucleic Acids Res.* *6*, 715–732.
- Guilliam, T.A., Keen, B.A., Brissett, N.C., and Doherty, A.J. (2015). Primase-polymerases are a functionally diverse superfamily of replication and repair enzymes. *Nucleic Acids Res.* *43*, 6651–6664.
- Her, J., Ray, C., Altshuler, J., Zheng, H., and Bunting, S.F. (2018). 53BP1 Mediates ATR-Chk1 Signaling and Protects Replication Forks under Conditions of Replication Stress. *Mol. Cell. Biol.* *38*, 1–17.
- Hockensmith, J.W., Kubasek, W.L., Vorachek, W.R., and Hippel, P.H. Von (1986). Laser Cross-

- linking of Nucleic Acids to Proteins. *261*, 3512–3518.
- Lee, F.C.Y., and Ule, J. (2018). Advances in CLIP Technologies for Studies of Protein-RNA Interactions. *Mol. Cell* *69*, 354–369.
- Lottersberger, F., Bothmer, A., Robbiani, D.F., Nussenzweig, M.C., and Lange, T. De (2013). Role of 53BP1 oligomerization in regulating double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 2–7.
- Michelini, F., Pitchiaya, S., Vitelli, V., Sharma, S., Gioia, U., Pessina, F., Cabrini, M., Wang, Y., Capozzo, I., Iannelli, F., et al. (2017). Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1400–1411.
- Michelini, F., Jalihal, A.P., Francia, S., Meers, C., Neeb, Z.T., Rossiello, F., Gioia, U., Aguado, J., Jones-Weinert, C., Luke, B., et al. (2018). From “Cellular” RNA to “Smart” RNA: Multiple Roles of RNA in Genome Stability and Beyond. *Chem. Rev.* *118*, 4365–4403.
- Panier, S., and Boulton, S.J. (2013). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 7–18.
- Pessina, F., Giavazzi, F., Yin, Y., Gioia, U., Vitelli, V., Galbiati, A., Barozzi, S., Garre, M., Oldani, A., Flaus, A., et al. (2019). Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors. *Nat. Cell Biol.* *21*, 1286–1299.
- Pryde, F. (2005). 53BP1 exchanges slowly at the sites of DNA damage and appears to require RNA for its association with chromatin. *J. Cell Sci.* *118*, 2043–2055.
- Queiroz, R.M.L., Smith, T., Villanueva, E., Marti-Solano, M., Monti, M., Pizzinga, M., Mirea, D.-M., Ramakrishna, M., Harvey, R.F., Dezi, V., et al. (2019). Comprehensive identification of RNA–protein interactions in any organism using orthogonal organic phase separation (OOPS). *Nat. Biotechnol.* 1–18.
- Roy, S., Luzwick, J.W., and Schlacher, K. (2018). SIRF: Quantitative in situ analysis of protein interactions at DNA replication forks. *J. Cell Biol.* *217*, 1553.
- Sengupta, S., Robles, A.I., Linke, S.P., Sinogeeva, N.I., Zhang, R., Pedoux, R., Ward, I.M., Celeste, A., Nussenzweig, A., Chen, J., et al. (2004). Functional interaction between BLM helicase and 53BP1 in a Chk1-mediated pathway during S-phase arrest. *J. Cell Biol.* *166*, 801–813.
- Steen, H., Petersen, J., Mann, M., and Jensen, O.L.E.N. (2001). Mass spectrometric analysis of a UV-cross-linked protein – DNA complex : Tryptophans 54 and 88 of E . coli SSB cross-link to DNA. *Protein Sci.* 1989–2001.
- Thandapani, P., O’Connor, T.R., Bailey, T.L., and Richard, S. (2013). Defining the RGG/RG Motif. *Mol. Cell* *50*, 613–623.

- Trendel, J., Schwarzl, T., Horos, R., Prakash, A., Bateman, A., Hentze, M.W., and Krijgsveld, J. (2018). The Human RNA-Binding Proteome and Its Dynamics during Translational Arrest. *Cell* 176, 1–33.
- Tripathi, V., Nagarjuna, T., and Sengupta, S. (2007). BLM helicase-dependent and -independent roles of 53BP1 during replication stress-mediated homologous recombination. *J. Cell Biol.* 178, 9–14.
- Vasilyev, N., Polonskaia, A., Darnell, J.C., Darnell, R.B., and Patel, D.J. (2015). Crystal structure reveals specific recognition of a G-quadruplex RNA by a β -turn in the RGG motif of FMRP. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Villa, M., Bonetti, D., Carraro, M., and Longhese, M.P. (2018). Rad9/53BP1 protects stalled replication forks from degradation in Mec1/ATR-defective cells. *EMBO Rep.* 19, 351–367.

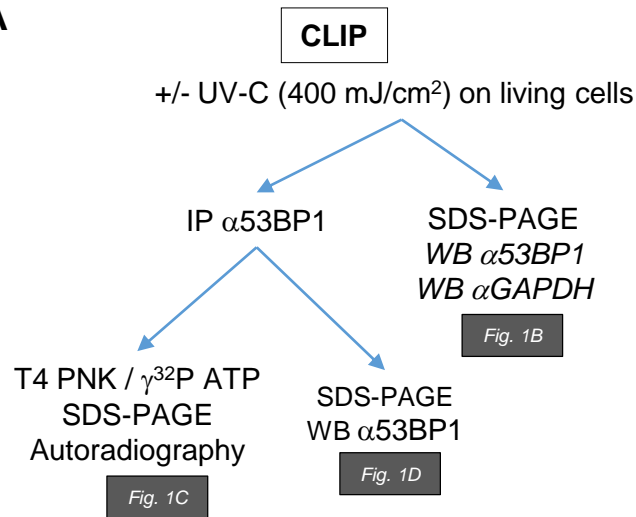
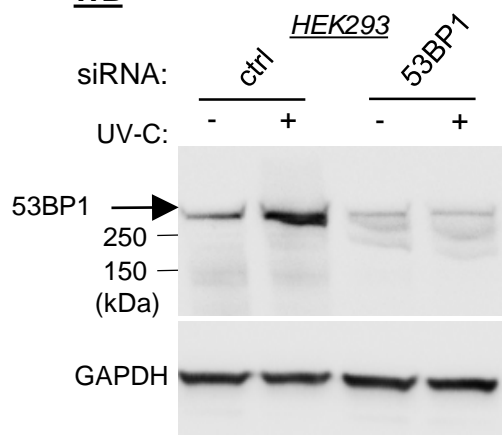
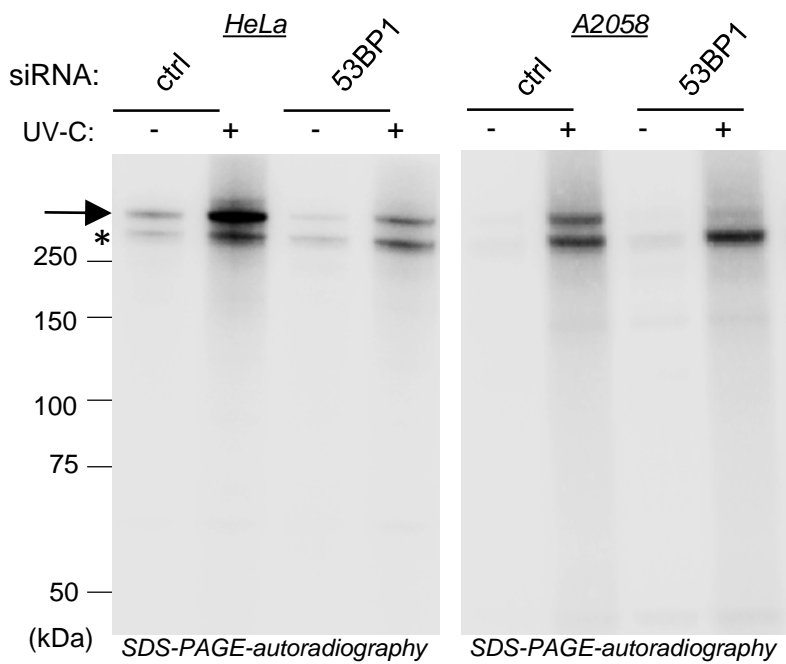
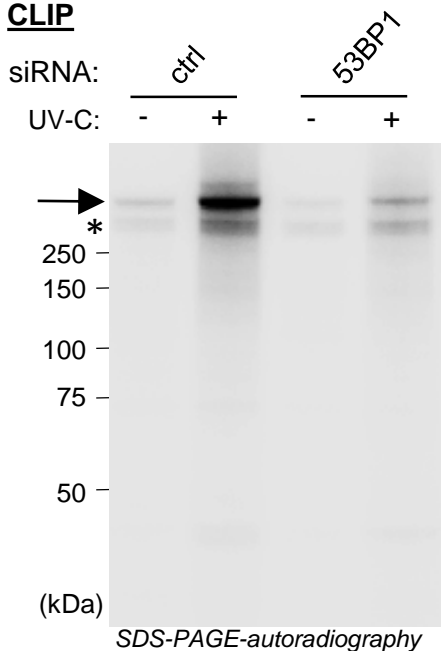
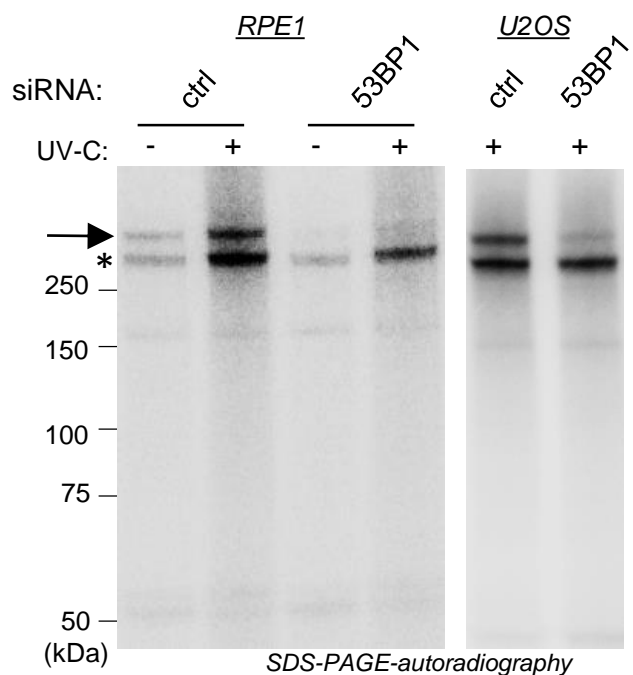
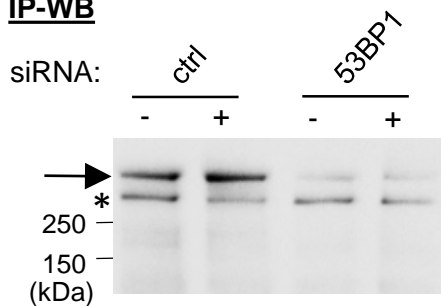
Figure 1**A****B** **WB****E** **CLIP****C** **CLIP****D** **IP-WB**

Figure 2

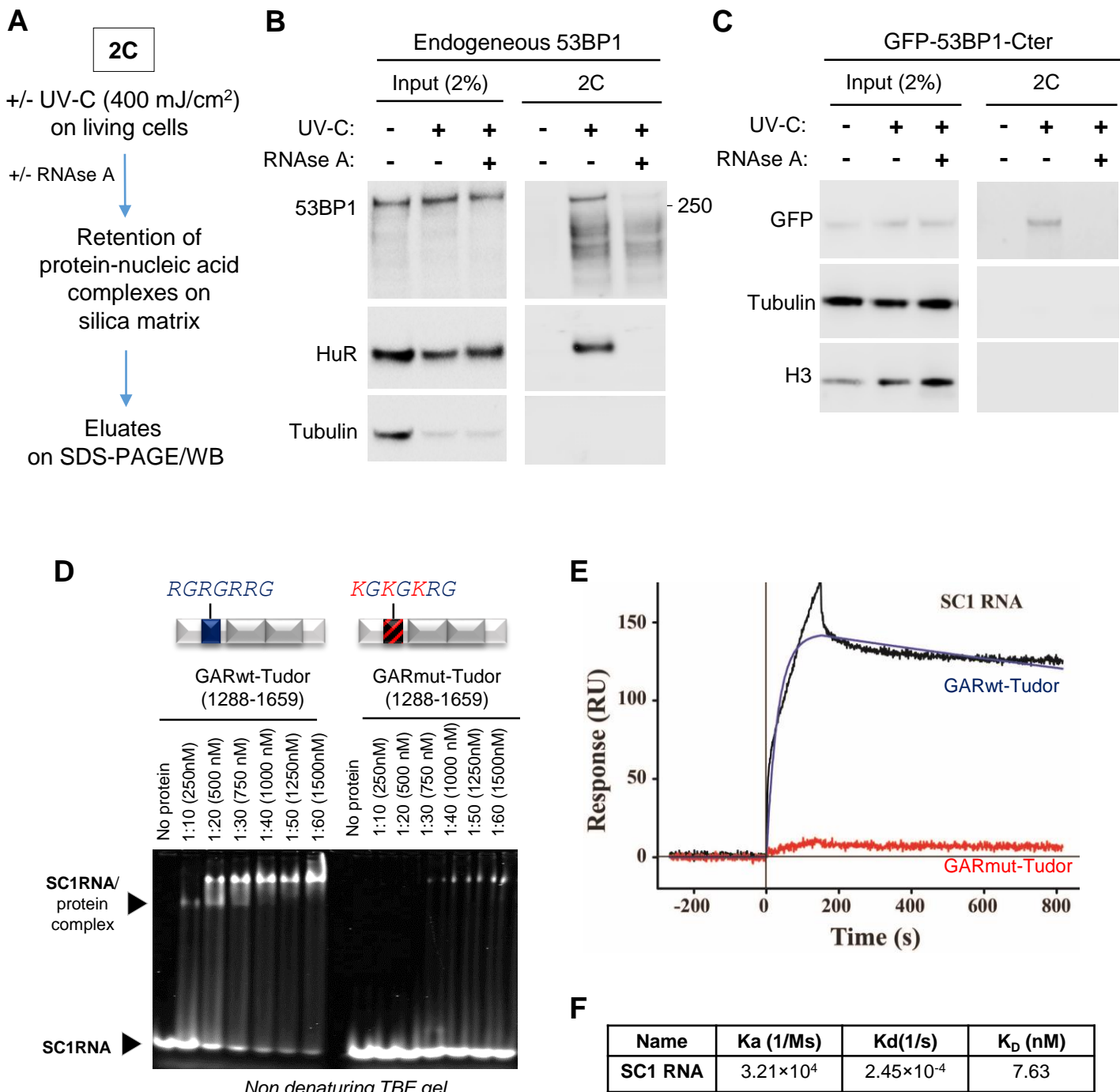


Figure 3

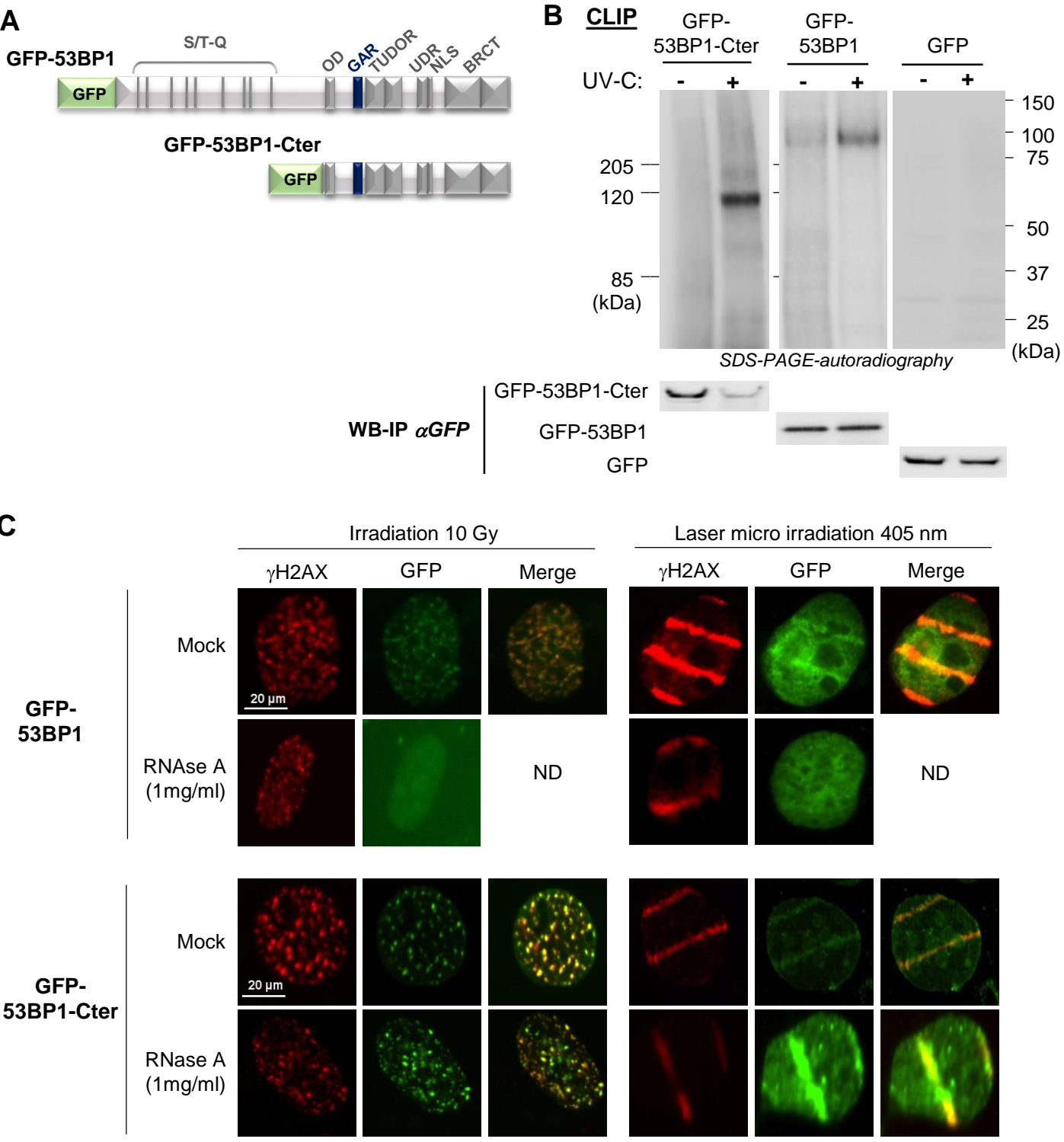


Figure 4

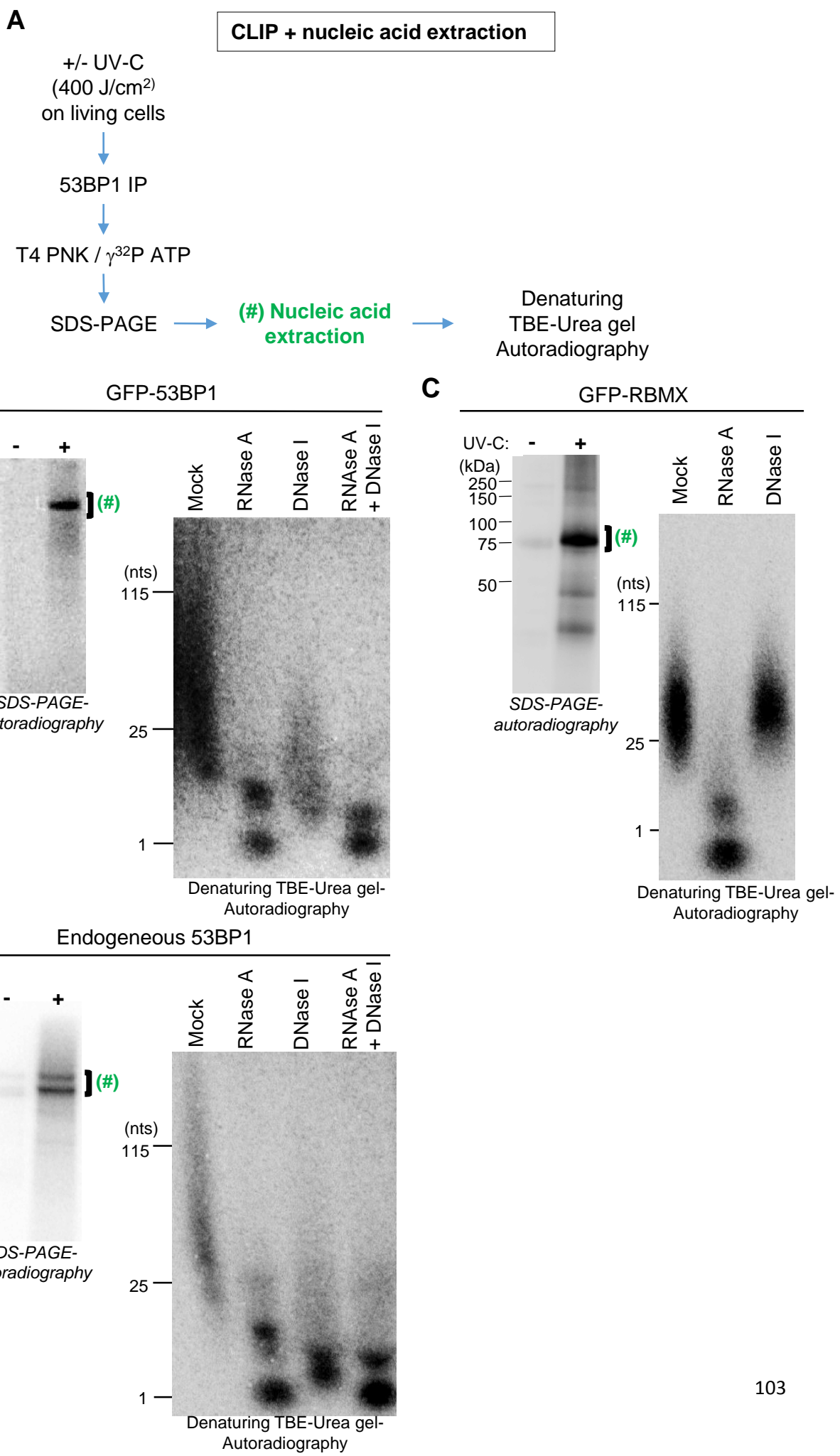
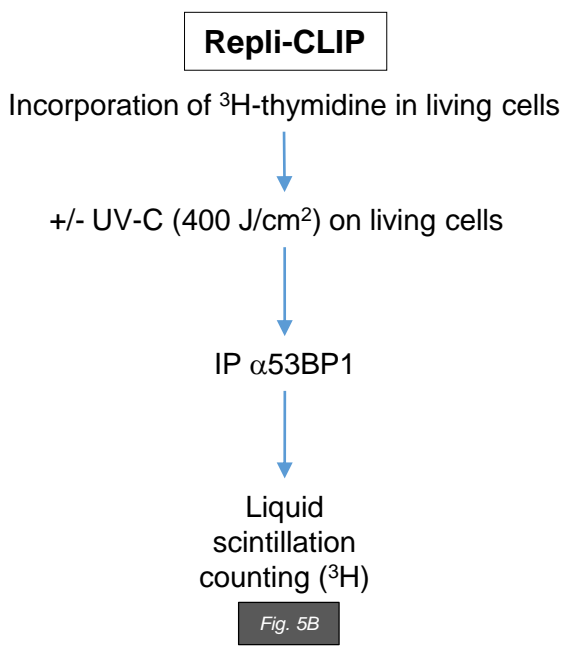


Figure 5

A



B

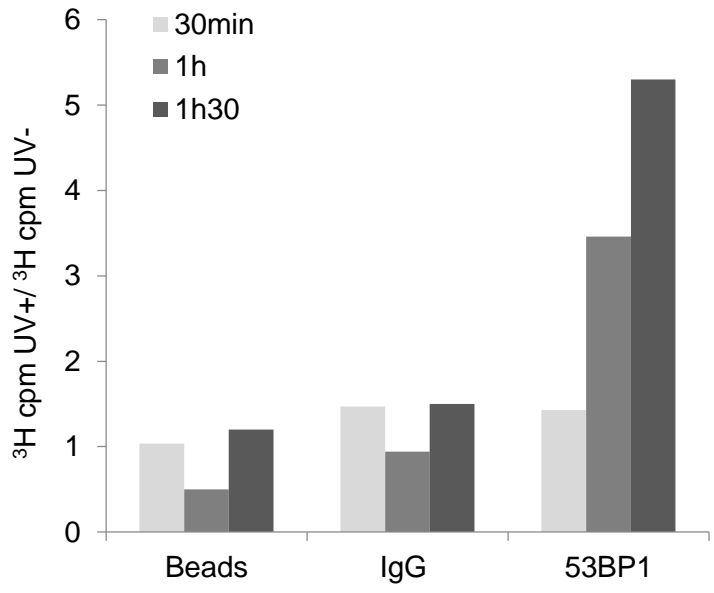


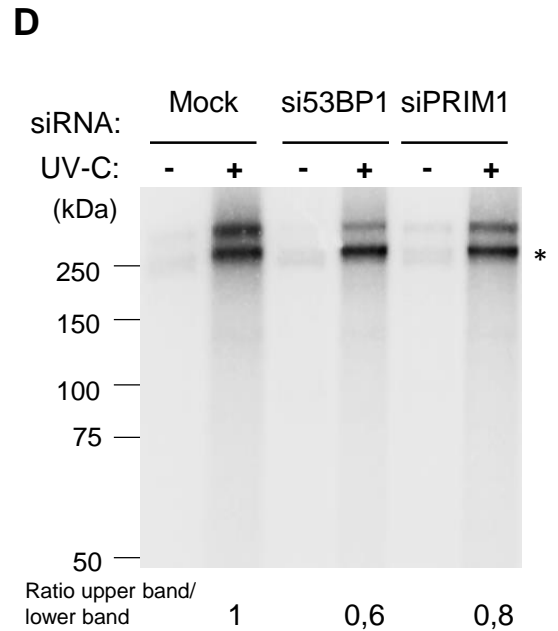
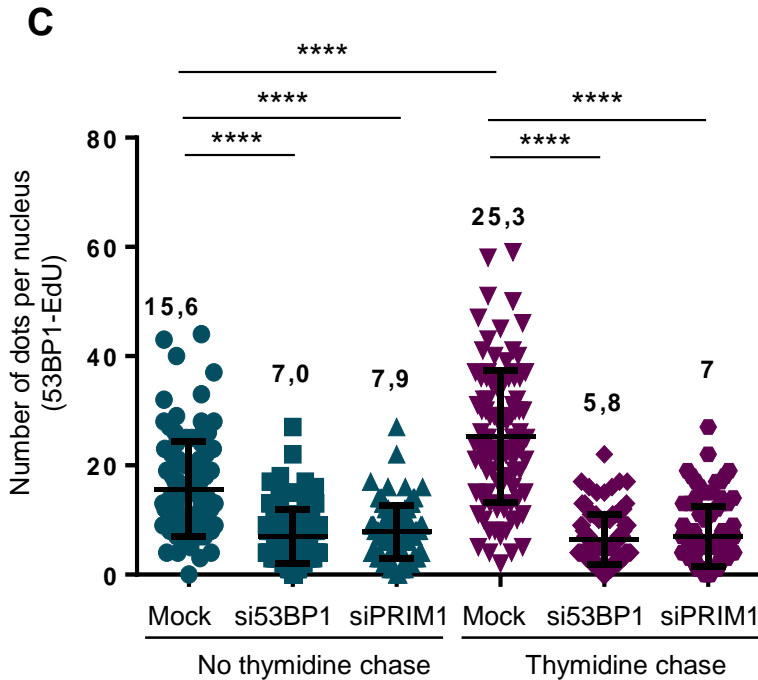
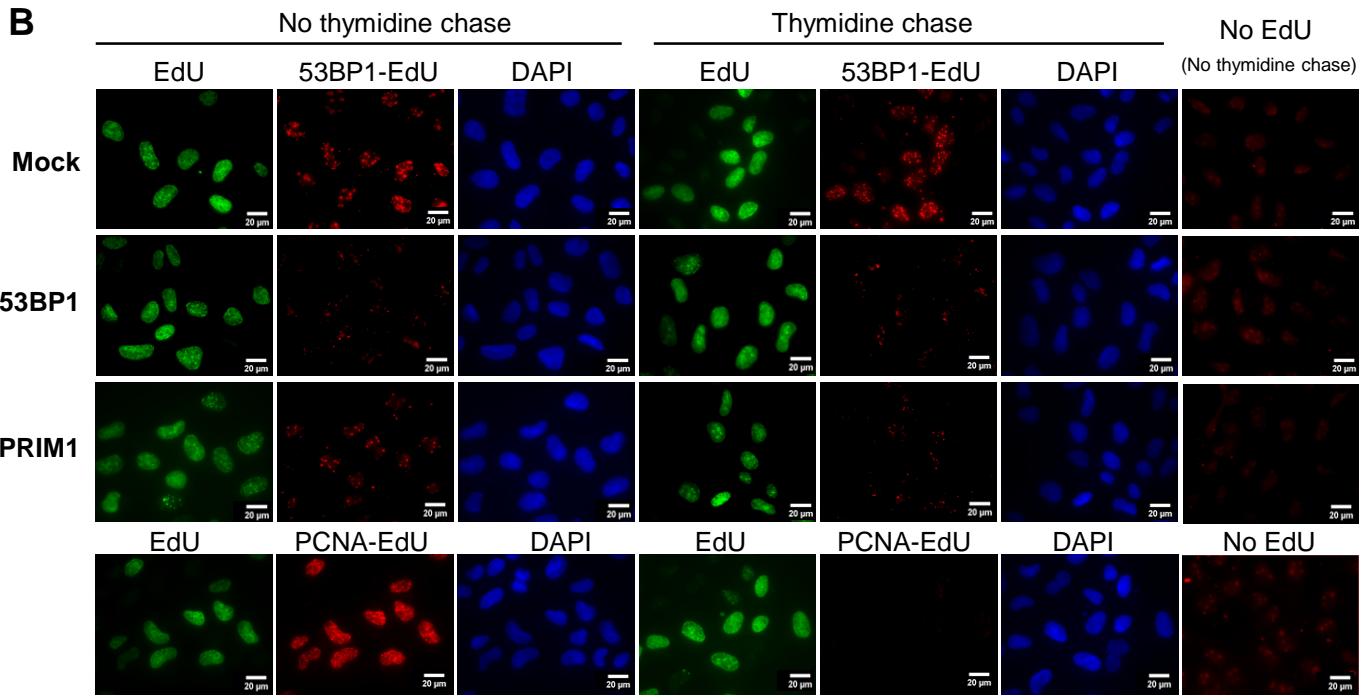
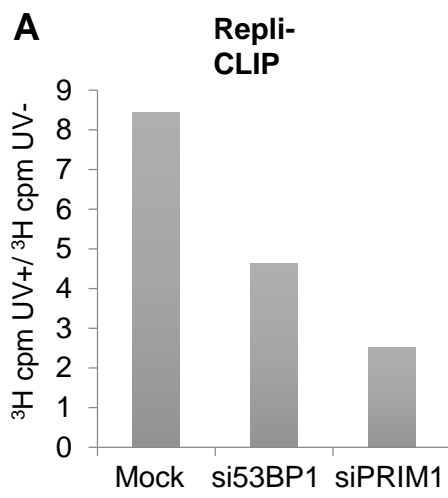
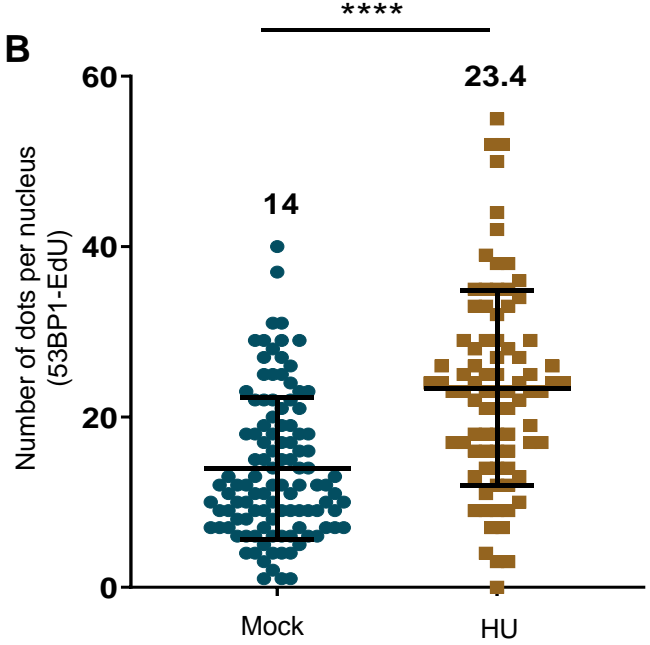
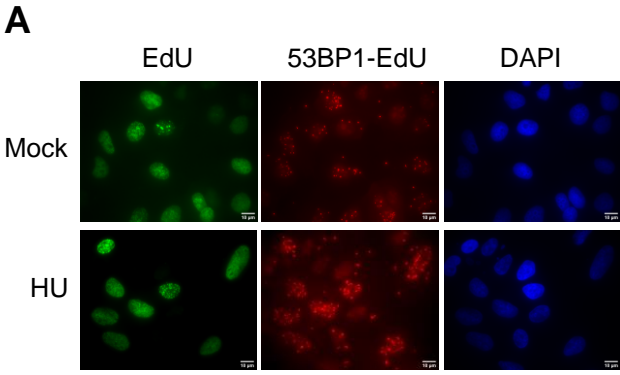
Figure 6

Figure 7



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence la capacité de liaison directe de 53BP1 aux acides nucléiques. Plus particulièrement, 53BP1 interagit avec des fragments d'Okazaki, et ce, indépendamment de son rôle dans la réparation des dommages de l'ADN. De plus, dans un contexte de stress de réplication induit par l'hydroxyurée, nous avons observé une augmentation de l'interaction de 53BP1 avec les fragments d'Okazaki. Afin d'appréhender au mieux un nouveau rôle de 53BP1 dans la réplication de l'ADN, je discuterai des résultats au regard de la littérature, tout en émettant des hypothèses quant au nouveau rôle de 53BP1 ainsi que les stratégies expérimentales que l'on pourrait appliquer pour le mettre en évidence.

1. Vers un nouveau rôle de 53BP1 dans la réplication de l'ADN

Ces dernières années, 53BP1 émerge de plus en plus comme étant un acteur important impliqué dans la réplication de l'ADN et la réponse au stress répliatif. Comme pour le choix de la voie de réparation des DSB en phase G1 du cycle cellulaire, 53BP1 est impliquée dans le contrôle du choix de la voie de redémarrage des fourches de réplication bloquées (Xu et al., 2017), mais également dans leur protection en empêchant leur dégradation par les nucléases (Her et al., 2018; Villa et al., 2018).

J'ai montré, par SIRF et repli-CLIP, que 53BP1 est présent au niveau des fourches de réplication et plus précisément au niveau de l'ADN nouvellement synthétisé. Ceci est en accord avec l'étude de Her et al. qui montre par iPOND (« *isolation of protein on nascent DNA* ») que la présence de 53BP1 à l'ADN naissant après un stress de réplication induit par l'hydroxyurée est augmentée comparée à la condition sans traitement, bien que les données sur les cellules non traitées ne soient pas fournies (Her et al., 2018). Dans cette même étude, les auteurs comparent, par immunofluorescence, le pourcentage de colocalisation des foyers 53BP1 avec RPA (qui se lie aux régions d'ADN simple-brin qui sont exposées par les hélicases pendant la phase S) avant et après un traitement à l'hydroxyurée. Ce pourcentage passe de 2,2% à 7,5% alors que le pourcentage de colocalisation de RPA et TopBP1 (qui a un rôle bien connu dans l'activation de la voie de signalisation ATR aux fourches de réplication bloquées) est de 31,57% après un stress de réplication. Les auteurs en concluent que 53BP1 se relocalise à un sous-ensemble seulement de fourches bloquées (Her et al., 2018). Ici, notre étude montre en plus que 53BP1 est retrouvée au niveau de l'ADN naissant en absence de stress répliatif, et que sa présence est augmentée sous stress répliatif induit par l'hydroxyurée. D'après les expériences de SIRF, qui nous permettent de dire qu'une protéine se trouve à proximité de l'ADN naissant, on pourrait penser que 53BP1 se relocalise au niveau de l'amorce ARN du fragment d'Okazaki, à proximité de la partie ADN adjacente puisqu'elle est retrouvée à moins de 40 nanomètres de la biotine, donc de l'ADN nouvellement synthétisé, et qu'elle lie l'ARN (montré par CLIP et 2C). Il n'est pas exclu qu'entre 53BP1 et la biotine (i.e. l'ADN), il y ait d'autres facteurs protéiques qui lient 53BP1 et nous permettent de

détecter un signal PLA, car la technique de PLA reflète une proximité et non une interaction entre deux protéines. Le fait que la protéine 53BP1 puisse être à proximité du fragment d'ADN des fragments d'Okazaki nous laisse penser qu'elle pourrait être importante pour leur maturation. Cette idée est confortée par le fait que lorsque les cellules sont déplétées en FEN1 ou DNA2, enzymes responsables du retrait de l'amorce ARN des fragments d'Okazaki, il y a une augmentation du nombre de signaux PLA (données non montrées, N=1). Ceci conforte également l'hypothèse que 53BP1 lie les fragments d'Okazaki puisque si les amorces ARN ne sont pas excisées, il y a plus d'amorces présentes et donc plus de 53BP1 fixées sur celles-ci. De la même manière, lors d'un stress répliatif induit par l'hydroxyurée, les fourches de réplication sont bloquées, impliquant qu'il y ait une accumulation des fragments d'Okazaki non matures et donc une augmentation de la présence de 53BP1, ce que nous avons effectivement montré. Par la suite, il pourrait être envisagé de voir si 53BP1 interagit physiquement avec les enzymes de maturation des fragments d'Okazaki afin de savoir si 53BP1 est impliquée directement dans la régulation de leur maturation. Etant donné que 53BP1 protège les fourches de réplication bloquées de la dégradation par les nucléases, on pourrait également penser qu'elle empêche la maturation ou stabilise la structure des fragments d'Okazaki.

Nous avons observé par SIRF que 53BP1 est présente au niveau de l'ADN naissant après un pulse d'EdU qu'il soit suivi ou non d'une chasse de 4 heures à la thymidine. Le pulse suivi d'une chasse permet de suivre la dynamique des facteurs de la réplication, associés ou non au réplisome. La distance entre la portion d'ADN marquée EdU et la fourche va augmenter en fonction de la durée de la chasse à la thymidine. PCNA, une protéine associée au réplisome, n'est plus marquée après la chasse de 4 heures puisqu'elle n'est plus présente derrière le fragment marqué EdU. Or, 53BP1 l'est toujours. La raison pour laquelle 53BP1 est toujours présente à l'ADN naissant après la chasse n'est pas connue, mais on pourrait penser, là encore, qu'elle stabilise les fragments d'Okazaki non matures, par exemple ceux riches en guanine (G), puisque le domaine GAR de 53BP1 est susceptible de reconnaître les régions riches en G comme la protéine FMRP qui reconnaît des structures en G-quadruplex de l'ARN *sc1* (Phan et al., 2011; Vasilyev et al., 2015).

Une autre hypothèse serait que 53BP1 aurait un rôle limitant l'activation de voies de l'immunité innée. En effet, dans la littérature, des études montrent que des protéines de réparation ou réplication de l'ADN telles que ATM et RAD51, préviennent l'activation du système immunitaire inné (Bhattacharya et al., 2017; Weiss et al., 2015). La déplétion de ces protéines induit une augmentation de l'ADN « du soi » cytosolique, conduisant au déclenchement d'une réponse immunitaire innée médiée par la voie cGAS-STING, après un stress de réplication. La voie cGAS-STING est responsable de la reconnaissance d'ADN double-brin cytosolique pour l'activation *in fine* de l'immunité innée. Dans notre cas, l'hypothèse serait que les fragments d'Okazaki sont pris en charge par 53BP1 et emmenés, après avoir été excisés

par la voie du long flap, à la dégradation pour empêcher l'activation de l'immunité innée. Dans la cellule, plusieurs nucléases sont responsables de la dégradation de l'ADN et ou de l'ARN. On peut citer par exemple TREX1 qui dégrade l'ADN simple brin (Stetson et al., 2008; Yang et al., 2007) ; la RNase H2 qui dégrade l'ARN dans les hybrides ARN:ADN (Figiel et al., 2011) et SAMHD1, qui dégrade l'ARN et l'ADN simple brin et également l'ARN dans les hybrides ARN/ADN (Beloglazova et al., 2013). Enfin, le fait que 53BP1 puisse prévenir l'activation de l'immunité innée est appuyé par l'observation, en western blot, de l'activation de marqueurs de l'immunité innée en l'absence de 53BP1, dont MX1 et MX2 dans les cellules U2OS (données non montrées, N=1). MX1 et MX2 sont des gènes stimulés par l'interféron (« *interferon stimulated genes* » ou ISG) activés en aval de l'activation de la voie cGAS-STING. Toutefois, étant donné que les U2OS n'expriment pas STING et que ce ne sont pas des molécules double-brin d'ADN qu'il faut détecter ici mais des chimères ARN:ADN, l'activation de l'immunité innée se ferait par une autre voie, indépendamment de cGAS-STING. On pourrait citer par exemple le senseur d'ARN RIG-I qui possède dans sa partie C-terminale un domaine capable de reconnaître le 5'phosphate des ARN simple ou double-brin viraux et peut également reconnaître des ARN endogènes non-codants courts (Jensen and Thomsen, 2012; Ranoa et al., 2016). La suite du travail consisterait à voir l'expression d'autres marqueurs de la voie interféron sous déplétion de 53BP1 et à détecter la présence éventuelle de chimères ARN:ADN dans le cytosol, afin de confirmer un rôle de 53BP1 dans la prévention de l'activation de l'immunité innée.

Finalement, ces données vont vers une fonction de régulation de la maturation des fragments d'Okazaki par 53BP1, tout en empêchant l'activation du système immunitaire inné, qui aurait un impact délétère pour la cellule.

Du fait que 53BP1 lie probablement un sous-ensemble seulement de fragments d'Okazaki, l'étude et la caractérisation de son rôle dans la réplication de l'ADN ne sont pas évidentes et difficiles à mettre en œuvre. Par exemple, il avait été envisagé d'appliquer l'OK-seq (séquençage des fragments d'Okazaki ; Petryk et al., 2016) après le CLIP, ce qui nous aurait permis de confirmer avec quel type de fragments d'Okazaki 53BP1 interagit. Cependant la quantité très limitée de matériel récupéré après le CLIP n'a pas permis de mettre en œuvre cette approche.

2. 53BP1 est une protéine de liaison à l'ARN

Nous avons montré que 53BP1 lie l'ARN dans sa partie carboxy-terminale (C-ter) et que la mutation du domaine GAR affecte cette interaction. Nous concluons donc que 53BP1 est une protéine de liaison à l'ARN et que son domaine GAR serait capable d'interagir avec l'ARN. En plus du domaine GAR, il a été montré que 53BP1 aurait la capacité de lier l'ARN dans sa partie amino-terminale (N-ter). Ces propos se basent sur une étude de 2019, présentant la technique du OOPS (décrite dans la première

partie de l'introduction, page18) (Queiroz et al., 2019a). Dans cette étude, après extraction des protéines liées aux ARN et analyse par spectrométrie de masse, les résultats semblent révéler que 53BP1 lierait l'ARN entre les acides aminés 192 et 207, donc dans sa partie N-ter (Queiroz et al., 2019a). Une autre étude, qui introduit la technique du XRNAX (pour « *protein-crosslinked RNA eXtraction* »), portant sur la caractérisation des interactions ARN-protéine au sein des cellules et sur l'étude des changements dynamiques du protéome lié aux ARN, montre un enrichissement de 25 peptides pour 53BP1 par spectrométrie de masse, suggérant une liaison de 53BP1 avec des ARN (Trendel et al., 2019). Il a également été montré dans cette même étude qu'après un stress induit par l'arsénite, l'association de 53BP1 avec les ARN est significativement augmentée de 2 fois (Trendel et al., 2019). Cependant les auteurs n'ont pas été en mesure de prédire la séquence peptidique de 53BP1 où pourrait se lier l'ARN. Ces études suggèrent donc qu'il n'est pas exclu que 53BP1 lie l'ARN dans d'autres régions protéiques que son domaine GAR. Pour savoir si cela est le cas, il pourrait être envisagé d'utiliser des protéines 53BP1 délétées pour un ou plusieurs de ses autres domaines protéiques et faire des expériences de CLIP et de 2C (présentés en ANNEXE 1 et 2).

Deux autres éléments nous permettent de renforcer nos propos quant au fait que 53BP1 soit une RBP. En effet, il a été montré que les protéines possédant des régions intrinsèquement désordonnées, telles que le domaine GAR, sont impliquées dans le phénomène de séparation de phase, un phénomène physique correspondant à la formation d'organites sans membrane et permettant à la cellule de compartimenter des molécules et fonctions spécifiques (Banani et al., 2017; Chong et al., 2018). Il a été montré récemment que 53BP1 s'organise ainsi en « gouttelette » pour aider à coordonner la reconnaissance locale des lésions de l'ADN et faciliter la régulation de gènes en réponse aux dommages de l'ADN (Kilic et al., 2019; Piccinno et al., 2019). Enfin, en plus du domaine GAR, 53BP1 semblerait, d'après un logiciel de prédiction des régions désordonnées (PONDR®), posséder de nombreuses autres régions intrinsèquement désordonnées (Figure 22).

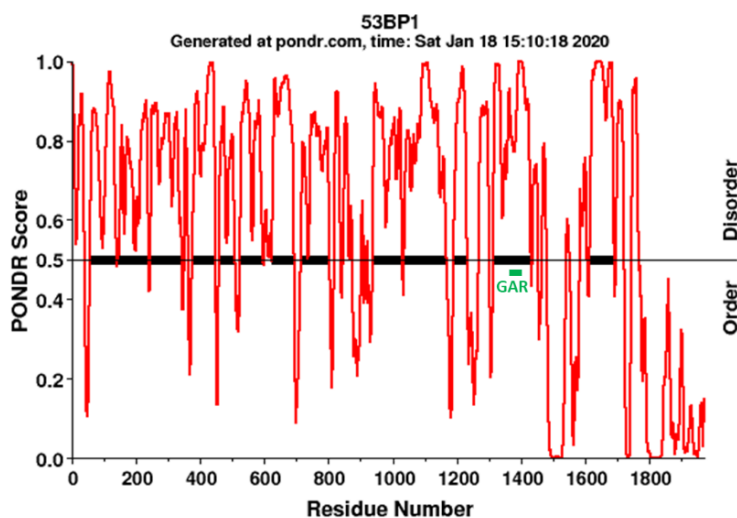


Figure 22 : 53BP1, une protéine intrinsèquement désordonnée. Graphique représentant les régions intrinsèquement désordonnées (axe y) de la séquence d'acides aminés de 53BP1 (axe x) analysés par PONDR®. Les scores supérieurs à 0,5 indiquent les régions désordonnées prédites. Le domaine GAR est représenté par un rectangle vert.

Enfin, il a été montré que la méthylation des arginines du domaine GAR de 53BP1 par la méthyltransférase PRMT1 est requise pour son activité de liaison à l'ADN suite à un dommage (**Boisvert et al., 2005**). Il serait donc intéressant de savoir si ces méthylations ont un impact sur la liaison de 53BP1 aux fragments d'Okazaki. Pour cela, nous pourrions étudier les effets de la déplétion ou de l'inhibition de PRMT1 par SIRF, par exemple.

Ainsi toutes ces études confortent nos résultats quant au fait que 53BP1 lie l'ARN. Cependant, il n'est pas exclu qu'elle puisse lier l'ARN ailleurs que dans son domaine GAR.

Afin d'avoir une vision plus générale du rôle de 53BP1 dans la réplication de l'ADN mais également afin de connaître l'importance de ses différents domaines protéiques dans la réplication de l'ADN et/ou dans la réponse au stress réplcatif, nous nous proposons de tester la mutation ou la délétion de son domaine GAR ainsi que d'autres domaines dans des cellules déplétées en 53BP1 (par siRNA ou dégron inductible). Ces approches seraient :

- Le peignage moléculaire d'ADN ou « *DNA combing* » (**Bensimon et al., 1994; Her et al., 2018**). Cette approche permet l'analyse spatio-temporelle de la réplication de l'ADN. Le principe repose sur l'isolement d'ADN répliqué de cellules ayant incorporé des analogues de la thymidine (IdU et CldU par exemple) et de le soumettre à un peignage moléculaire. En combinant à l'immunofluorescence les molécules d'ADN peignées, différentes informations peuvent être obtenues telles que la vitesse de progression des fourches de réplication ou le taux d'initiation de la réplication. Les conséquences d'un stress réplcatif peuvent également être étudiées simultanément à la déplétion et/ou la mutation des différents domaines de 53BP1.

- Le QIBC ou « *quantitative image-based cytometry* » (**Kilic et al., 2019; Ochs et al., 2016; Toledo et al., 2013**). Cette approche permet, au sein d'une population cellulaire asynchrone, d'évaluer et de quantifier plusieurs marqueurs cellulaires à la fois, dans les cellules individuelles et de les corrélérer avec les phases du cycle cellulaire. Ainsi, on pourrait étudier l'effet de la mutation/délétion des différents domaines de 53BP1 sous déplétion 53BP1 sur les niveaux de différents marqueurs de la réplication tels que MCM7 (initiation de la réplication), TIMELESS (indicateur de fourche active), RPA2 (réparation de l'ADN et recombinaison), FEN1 et DNA2 (maturation des fragments d'Okazaki) ou du DDR.

Ainsi, à l'aide de ces méthodes, les phénotypes associés aux différents mutants nous permettront de déterminer si à un domaine, une fonction (i.e ; réplication ou réparation) peut être associée.

REFERENCES

- Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Lal, A., Kim, H.H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J.D., Walker, M., Shubert, J., Gillespie, D.A., et al. (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 Regulates SIRT1 Expression. *Mol. Cell* 7, 543–557.
- Adamson, B., Smogorzewska, A., Sigoillot, F.D., King, R.W., and Elledge, S.J. (2012). A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nat. Cell Biol.* 14, 318–328.
- Ahuja, A.K., Jodkowska, K., Teloni, F., Bizard, A.H., Zellweger, R., Herrador, R., Ortega, S., Hickson, I.D., Altmeyer, M., Mendez, J., et al. (2016). A short G1 phase imposes constitutive replication stress and fork remodelling in mouse embryonic stem cells. *Nat. Commun.* 7, 1–11.
- Ait Saada, A., Lambert, S.A.E., and Carr, A.M. (2018). Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway. *DNA Repair (Amst).* 71, 135–147.
- Anantha, R.W., Alcivar, A.L., Ma, J., Cai, H., Simhadri, S., Ule, J., König, J., and Xia, B. (2013). Requirement of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C for BRCA Gene Expression and Homologous Recombination. *PLoS One* 8.
- Asencio, C., Chatterjee, A., and Hentze, M.W. (2018). Silica-based solid-phase extraction of cross-linked nucleic acid-bound proteins. *Life Sci. Alliance* 1, 1–8.
- Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.* 279, 55117–55126.
- Aust, A.E., and Eveleigh, J.F. (1999). Mechanisms of DNA oxidation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 246–252.
- 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.
- Azzalin, C.M., and Lingner, J. (2006). The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Curr. Biol.* 16, 433–439.
- Bader, A.S., Hawley, B.R., Wilczynska, A., and Bushell, M. (2020). The roles of RNA in DNA double-strand break repair. *Br. J. Cancer.*
- Bakheet, T., Hitti, E., Al-Saif, M., Moghrabi, W.N., and Khabar, K.S.A. (2018). The AU-rich element landscape across human transcriptome reveals a large proportion in introns and regulation by ELAVL1/HuR. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1861, 167–177.
- Balakrishnan, L., and Bambara, R.A. (2013a). Okazaki Fragment Metabolism. *Brenner's Encycl. Genet.* Second Ed. 158–160.
- Balakrishnan, L., and Bambara, R.A. (2013b). Flap Endonuclease 1. *Annu. Rev. Biochem.*
- Baltz, A.G., Munschauer, M., Schwanhäusser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M., et al. (2012). The mRNA-Bound Proteome and Its Global Occupancy Profile on Protein-Coding Transcripts. *Mol. Cell* 46, 674–690.
- Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., and Rosen, M.K. (2017). Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 285–298.
- Barraud, P. (2013). RNA recognition by double-stranded RNA binding domains : a matter of shape and sequence.

- Cell. Mol. Life Sci. 1875–1895.
- Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). CHECKING ON DNA DAMAGE IN S PHASE. *Nature* 5, 792–805.
- Bass, T.E., Luzwick, J.W., Kavanaugh, G., Carroll, C., Dungrawala, H., Glick, G.G., Feldkamp, M.D., Putney, R., Chazin, W.J., and Cortez, D. (2016). ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nat. Cell Biol.* 18.
- Bębenek, A., and Ziuzia-Graczyk, I. (2018). Fidelity of DNA replication—a matter of proofreading. *Curr. Genet.* 64, 985–996.
- Beckmann, B.M., Horos, R., Fischer, B., Castello, A., Eichelbaum, K., Alleaume, A.M., Schwarzl, T., Curk, T., Foehr, S., Huber, W., et al. (2015). The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nat. Commun.* 6.
- Beckmann, B.M., Castello, A., and Medenbach, J. (2016). The expanding universe of ribonucleoproteins: of novel RNA-binding proteins and unconventional interactions. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 468, 1029–1040.
- Beli, P., Lukashchuk, N., Wagner, S.A., Weinert, B.T., Olsen, J. V, Baskcomb, L., Mann, M., Jackson, S.P., and Choudhary, C. (2012). Proteomic Investigations Reveal a Role for RNA Processing Factor THRAP3 in the DNA Damage Response. *Mol. Cell* 46, 212–225.
- Bell, B.S.P. (2014). Terminating the replisome. *Science* (80-).
- Beloglazova, N., Flick, R., Tchigvintsev, A., Brown, G., Popovic, A., Nocek, B., and Yakunin, A.F. (2013). Nuclease Activity of the Human SAMHD1 Protein Implicated in the Aicardi-Goutières Syndrome and HIV-1 Restriction. *J. Biol. Chem.* 288, 8101–8110.
- Bennetzen, M. V, Helena, D., Bunkenborg, J., Bartek, J., Lukas, J., and Andersen, J.S. (2010). Site-specific Phosphorylation Dynamics of the Nuclear Proteome during the DNA Damage Response. *Mol. Cell. Proteomics* 3–9.
- Bensimon, A., Simon, A., Chiffaudel, A., Croquette, V., Heslot, F., and Bensimon, D. (1994). Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* (80-). 265, 2096–2098.
- Bernstein, N.K., Williams, R.S., Rakovszky, M.L., Cui, D., Green, R., Karimi-busheri, F., Mani, R.S., Galicia, S., Koch, C.A., Cass, C.E., et al. (2005). The Molecular Architecture of the Mammalian DNA Repair Enzyme , Polynucleotide Kinase. *Mol. Cell* 17, 657–670.
- Bhatia, V., Barroso, S.I., García-Rubio, M.L., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., and Aguilera, A. (2014). BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2. *Nature* 511, 362–365.
- Bhattacharya, S., Srinivasan, K., Abdisalaam, S., Su, F., Raj, P., Dozmorov, I., Mishra, R., Wakeland, E.K., Ghose, S., Mukherjee, S., et al. (2017). RAD51 interconnects between DNA replication , DNA repair and immunity. *Nucleic Acids Res.* 45, 4590–4605.
- Biehs, R., Steinlage, M., Barton, O., Shibata, A., Jeggo, P.A., Lo, M., Spies, J., and Shibata, A. (2017). DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Mol. Cell* 671–684.
- Blasius, M., Forment, J. V, Thakkar, N., Wagner, S.A., Choudhary, C., and Jackson, S.P. (2011). A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. *Genome Biol.* 1–14.

- Blier, P.R., Griffith, A.J., Craft, J., and Hardin, J.A. (1993). Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J. Biol. Chem.* *268*, 7594–7601.
- Bochkarev, A., Bochkareva, E., Frappier, L., and Edwards, A.M. (1999). The crystal structure of the complex of replication protein A subunits RPA32 and RPA14 reveals a mechanism for single-stranded DNA binding. *EMBO J.* *18*, 4498–4504.
- Boehm, E.M., Gildenberg, M.S., and Washington, M.T. (2017). The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication. *Enzymes* 231–254.
- Boisvert, F.-M., Rhie, A., Richard, S., and Doherty, A.J. (2014). The GAR Motif of 53BP1 is Arginine Methylated by PRMT1 and is Necessary for 53BP1 DNA Binding Activity. *Cell Cycle* *4*, 1834–1841.
- Boisvert, F.M., Rhie, A., Richard, S., and Doherty, A.J. (2005). The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity. *Cell Cycle* *4*, 1834–1841.
- Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J., Thompson, J.R., Chen, J., and Mer, G. (2006). Structural Basis for the Methylation State-Specific Recognition of Histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA Repair. *Cell* 1361–1373.
- Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., Gulden, H. Van Der, Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q., et al. (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*.
- Branzei, D., and Psakhye, I. (2016). DNA damage tolerance. *Curr. Opin. Cell Biol.* *40*, 137–144.
- Braun, C.J., Zhang, X., Savelyeva, I., Wolff, S., Moll, U.M., Schepeler, T., Ørntoft, T.F., Andersen, C.L., and Dobbstein, M. (2008). p53-responsive microRNAs 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res.* *68*, 10094–10104.
- Britton, S., Dernoncourt, E., Delteil, C., Froment, C., Schiltz, O., Salles, B., Frit, P., and Calsou, P. (2014). DNA damage triggers SAF-A and RNA biogenesis factors exclusion from chromatin coupled to R-loops removal. *Nucleic Acids Res.* *42*, 9047–9062.
- Bugreev, D. V., Rossi, M.J., and Mazin, A. V (2011). Cooperation of RAD51 and RAD54 in regression of a model replication fork. *Nucleic Acids Res.* *39*, 2153–2164.
- Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., et al. (2010). 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1 -Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell* 243–254.
- Burger, K., Schlackow, M., and Gullerova, M. (2019). Tyrosine kinase c-Abl couples RNA polymerase II transcription to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* *47*, 3467–3484.
- Byrum, A.K., Carvajal-Maldonado, D., Mudge, M.C., Valle-Garcia, D., Majid, M.C., Patel, R., Sowa, M.E., Gygi, S.P., Wade Harper, J., Shi, Y., et al. (2019). Mitotic regulators TPX2 and Aurora A protect DNA forks during replication stress by counteracting 53BP1 function. *J. Cell Biol.* *218*, 422–432.
- Cadet, J., and Richard Wagner, J. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, 1–18.
- Carreira, A., Hilario, J., Amitani, I., Baskin, R.J., Shivji, M.K.K., Venkitaraman, A.R., and Kowalczykowski, S.C. (2009). The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA-Binding Selectivity of RAD51. *Cell* *136*, 1032–1043.

- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B.M., Strein, C., Davey, N.E., Humphreys, D.T., Preiss, T., Steinmetz, L.M., et al. (2012). Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell* 149, 1393–1406.
- Castello, A., Fischer, B., Frese, C.K., Horos, R., Alleaume, A.M., Foehr, S., Curk, T., Krijgsveld, J., and Hentze, M.W. (2016). Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Mol. Cell* 63, 696–710.
- Chai, Q., Zheng, L., Zhou, M., Turchi, J.J., and Shen, B. (2003). Interaction and Stimulation of Human FEN-1 Nuclease Activities by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 in α -Segment Processing during Okazaki Fragment Maturation. *Biochemistry* 42, 15045–15052.
- Chang, H.H.Y., and Lieber, M.R. (2016). Structure-Specific nuclease activities of Artemis and the Artemis : DNA-PKcs complex. *Nucleic Acids Res.* 44, 4991–4997.
- Chang, H.H.Y., Watanabe, G., and Lieber, M.R. (2015). Unifying the DNA End-processing Roles of the Artemis. *J. Biol. Chem.* 290, 24036–24050.
- 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. Publ. Gr.* 18, 495–506.
- Chang, S., Wang, R.H., Akagi, K., Kim, K.A., Martin, B.K., Cavallone, L., Haines, D.C., Basik, M., Mai, P., Poggi, E., et al. (2011). Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. *Nat. Med.* 17, 1275–1282.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., and Boulton, S.J. (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* 47, 497–510.
- Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.-B., Borel, V., Steger, M., Sartori, A.T.-L.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*.
- 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.
- Chen, P.B., Chen, H. V., Acharya, D., Rando, O.J., and Fazzio, T.G. (2015). R loops regulate promoter-proximal chromatin architecture and cellular differentiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 999–1007.
- Chong, P.A., Vernon, R.M., and Forman-Kay, J.D. (2018). RGG/RG Motif Regions in RNA Binding and Phase Separation. *J. Mol. Biol.* 430, 4650–4665.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response : Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* 40, 179–204.
- Coates, J., Jackson, S.P., Calsou, P., and Chanut, P. (2016). Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks.
- Conrad, T., Albrecht, A.S., De Melo Costa, V.R., Sauer, S., Meierhofer, D., and Ørom, U.A. (2016). Serial interactome capture of the human cell nucleus. *Nat. Commun.* 7, 1–11.
- Cooper, T.A., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2009). RNA and Disease. *Cell* 777–793.
- Cortez, D. (2015). Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity. *DNA Repair (Amst).* 32, 149–157.
- Coster, G., and Goldberg, M. (2010). The cellular response to DNA damage : A focus on MDC1 and its interacting

- proteins. *Nucleus* 1, 166–178.
- Courtot, L., and Hoffmann, J. (2018). The Protective Role of Dormant Origins in Response to Replicative Stress. *Int. J. Mol. Sci.*
- Cusanelli, E., and Chartrand, P. (2015). Telomeric repeat-containing RNA TERRA : a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. *Front. Genet.* 6, 1–9.
- Czubaty, A., Girstun, A., Kowalska-Loth, B., Trzcińska, A.M., Purta, E., Winczura, A., Grajkowski, W., and Staroń, K. (2005). Proteomic analysis of complexes formed by human topoisomerase I. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1749, 133–141.
- D’Alessandro, G., Whelan, D.R., Howard, S.M., Vitelli, V., Renaudin, X., Adamowicz, M., Iannelli, F., Jones-Weinert, C.W., Lee, M.Y., Matti, V., et al. (2018). BRCA2 controls DNA:RNA hybrid level at DSBs by mediating RNase H2 recruitment. *Nat. Commun.* 9.
- Daboussi, F., Courbet, S., Benhamou, S., Kannouche, P., Zdzienicka, M.Z., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2008). A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 162–166.
- Daley, J.M., and Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1380–1388.
- Daley, J.M., Niu, H., Miller, A.S., and Sung, P. (2015). Biochemical mechanism of DSB end resection and its regulation. *DNA Repair (Amst).* 32, 66–74.
- Daubner, G.M., Clery, A., and Frederic, H.-T.A. (2013). RRM – RNA recognition : NMR or crystallography . . . and new findings. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 100–108.
- Decorsiere, A., Cayrel, A., Vagner, S., and Millevoi, S. (2011). Essential role for the interaction between hnRNP H / F and a G quadruplex in 3’-end processing and function during DNA damage. *Genes Dev.* 220–225.
- Dewar, J.M., and Walter, J.C. (2017). Mechanisms of DNA replication termination. *Nat. Publ. Gr.* 18, 507–516.
- Dewar, J.M., Budzowska, M., and Walter, J.C. (2015). The mechanism of DNA replication termination in vertebrates. *Nature.*
- Doherty, A.J., and Jackson, S.P. (2001). DNA repair : How Ku makes ends meet. *Science (80-)*. 920–924.
- Driscoll, M.O., and Jeggo, P.A. (2006). The role of double-strand break repair — insights from human genetics. *Nat. Rev. Genet.* 7, 45–55.
- Dueva, R., and Iliakis, G. (2013). Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl. Cancer Res.* 2, 163–177.
- Dungrawala, H., Rose, K.L., Bhat, K.P., Mohni, K.N., Glick, G.G., Couch, F.B., and Cortez, D. (2015a). The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability. *Mol. Cell* 59, 998–1010.
- Dungrawala, H., Rose, K.L., Bhat, K.P., Mohni, K.N., Glick, G.G., Couch, F.B., and Cortez, D. (2015b). The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability. *Mol. Cell* 59, 998–1010.
- Dutertre, M., and Vagner, S. (2017a). DNA-Damage Response RNA-Binding Proteins (DDRBP): Perspectives from a New Class of Proteins and Their RNA Targets. *J. Mol. Biol.* 429, 3139–3145.

- Dutertre, M., and Vagner, S. (2017b). DNA-Damage Response RNA-Binding Proteins (DRBPs): Perspectives from a New Class of Proteins and Their RNA Targets. *J. Mol. Biol.* 429.
- Dutertre, M., Lambert, S., Carreira, A., Amor-Gu ret, M., and Vagner, S. (2014). DNA damage: RNA-binding proteins protect from near and far. *Trends Biochem. Sci.* 39.
- E.Krokan, H., and Bj ra, M. (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–17.
- Edmond, V., Moysan, E., Khochbin, S., Matthias, P., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., and Eymin, B. (2011). Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *EMBO J.* 30, 510–523.
- Escribano-D az, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T.F., Tk a , J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., et al. (2013). A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* 49, 872–883.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM , ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434.
- Falzon, M., Fewell, J.W., and Kuff, E.L. (1993). EBP-80, a transcription factor closely resembling the human autoantigen Ku, recognizes single- to double-strand transitions in DNA. *J. Biol. Chem.* 268, 10546–10552.
- Fang, Y., and Fullwood, M.J. (2016). Roles , Functions , and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* 14, 42–54.
- Feng, S., Zhao, Y., Xu, Y., Ning, S., Huo, W., Hou, M., Gao, G., Ji, J., Guo, R., and Xu, D. (2016). Ewing Tumor-associated Antigen 1 Interacts with Replication Protein A to Promote Restart of Stalled Replication Forks *. *J. Biol. Chem.* 291, 21956–21962.
- Figiel, M., Chon, H., Cerritelli, S.M., Cybulska, M., and Crouch, R.J. (2011). The Structural and Biochemical Characterization of Human RNase H2 Complex Reveals the Molecular Basis for Substrate Recognition and Aicardi-Goutie `res Syndrome Defects. *J. Biol. Chem.* 286, 10540–10550.
- Filippo, J.S., Chi, P., Sehorn, M.G., Etchin, J., Krejci, L., and Sung, P. (2006). Recombination Mediator and Rad51 Targeting Activities of a Human BRCA2 Polypeptide. *J. Biol. Chem.* 281, 11649–11657.
- Fleck, O., and Nielsen, O. (2004). DNA repair. *J. Cell Sci.* 117, 515–517.
- Fnu, S., Williamson, E.A., Haro, L.P. De, Brenneman, M., Wray, J., and Shaheen, M. (2011). Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Errico, M.D., Simonelli, V., and Dogliotti, E. (2003). 8-Oxoguanine DNA damage : at the crossroad of alternative repair pathways. *531*, 127–139.
- Fradet-turcotte, A., Canny, M.D., and Escribano-d az, C. (2014). 53BP1 is a reader of the DNA damage-induced H2A Lys15 ubiquitin mark. *Nature* 499, 50–54.
- Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., and M chali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nature* 16.
- Francia, S., Michelini, F., Saxena, A., Tang, D., De Hoon, M., Anelli, V., Mione, M., Carninci, P., and D’adda Di Fagagna, F. (2012a). Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature* 488, 231–235.
- Francia, S., Michelini, F., Saxena, A., Tang, D., de Hoon, M., Anelli, V., Mione, M., Carninci, P., and d’Adda di

- Fagagna, F. (2012b). Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature* *488*, 231–235.
- Francia, S., Cabrini, M., Matti, V., Oldani, A., and d’Adda di Fagagna, F. (2016). DICER, DROSHA and DNA damage response RNAs are necessary for the secondary recruitment of DNA damage response factors. *J. Cell Sci.* *129*, 1468–1476.
- Gaillard, H., García-muse, T., and Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nat. Publ. Gr.* *15*, 276–289.
- Gajjar, M., Candeias, M.M., Malbert-colas, L., Mazars, A., and Fujita, J. (2012). The p53 mRNA-Mdm2 Interaction Controls Mdm2 Nuclear Trafficking and Is Required for p53 Activation following DNA Damage. *Cancer Cell* *25*–35.
- Ganai, R.A., and Johansson, E. (2016). DNA Replication-A Matter of Fidelity. *Mol. Cell* *62*, 745–755.
- Gardiner, M., Toth, R., Vandermoere, F., Morrice, N.A., and Rouse, J. (2008). Identification and characterization of FUS / TLS as a new target of ATM. *Biochem. J.* *307*, 297–307.
- Gazy, I., Zeevi, D.A., Renbaum, P., Zeligson, S., and Eini, L. (2015). TODRA , a lncRNA at the RAD51 Locus , Is Oppositely Regulated to RAD51 , and Enhances RAD51-Dependent DSB (Double Strand Break) Repair. *PLoS One* *1*–21.
- Gerstberger, S. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Genet.*
- Geuens, T., Bouhy, D., and Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum. Genet.* *135*, 851–867.
- Gloor, J.W., Balakrishnan, L., Campbell, J.L., and Bambara, R.A. (2012). Biochemical analyses indicate that binding and cleavage specificities define the ordered processing of human Okazaki fragments by Dna2 and FEN1. *Nucleic Acids Res.* *40*, 6774–6786.
- Graveley, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* *6*, 1197–1211.
- Greenberg, J.R. (1979). Ultraviolet light-induced crosslinking of mRNA to proteins. *Nucleic Acids Res.* *6*, 715–732.
- Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M.F., and Lieber, M.R. (2007a). XRCC4 : DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J.* *26*, 1010–1023.
- Gu, J., Lu, H., Tsai, A.G., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2007b). Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex : influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* *35*, 5755–5762.
- Gu, J., Li, S., Zhang, X., Wang, L., Niewolik, D., Schwarz, K., Legerski, R.J., Zandi, E., and Lieber, M.R. (2010). DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease activity of Artemis. *DNA Repair (Amst).* *9*, 429–437.
- Guilliam, T.A., Keen, B.A., Brissett, N.C., and Doherty, A.J. (2015). Primase-polymerases are a functionally diverse superfamily of replication and repair enzymes. *Nucleic Acids Res.* *43*, 6651–6664.
- Gupta, A., Hunt, C.R., Chakraborty, S., Pandita, R.K., Yordy, J., Ramnarain, D.B., Horikoshi, N., and Pandita, T.K. (2013). Role of 53BP1 in the Regulation of DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Radiat. Res.* *181*, 1–8.
- 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.

- Gutschner, T., and Diederichs, S. (2012). A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* 703–719.
- Hall, T.M.T. (2005). Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
- Han, S.P., Tang, Y.H., and Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: Past, present and perspectives. *Biochem. J.* 430, 379–392.
- Haronikova, L., Olivares-illana, V., Wang, L., Karakostis, K., Chen, S., Robin, F., and Nava, M. (2019). The p53 mRNA : an integral part of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res.* 47, 3257–3271.
- Hashimoto, Y., Chaudhuri, A.R., Lopes, M., and Costanzo, V. (2010). Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17.
- He, M., Zhou, W., Li, C., and Guo, M. (2016). MicroRNAs, DNA damage response, and cancer treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Heinrich, B., Zhang, Z., Raitskin, O., Hiller, M., Benderska, N., Hartmann, A.M., Bracco, L., Elliott, D., Ben-Ari, S., Soreq, H., et al. (2009). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G regulates splice site selection by binding to CC(A/C)-rich regions in pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* 284, 14303–14315.
- Helena, J.M., Joubert, A.M., Grobbelaar, S., Nolte, E.M., Nel, M., Pepper, M.S., Coetzee, M., and Mercier, A.E. (2018). Deoxyribonucleic acid damage and repair: Capitalizing on our understanding of the mechanisms of maintaining genomic integrity for therapeutic purposes. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Heller, R.C., Kang, S., Lam, W.M., Chen, S., Chan, C.S., and Bell, S.P. (2011). Eukaryotic Origin-Dependent DNA Replication In Vitro Reveals Sequential Action of DDK and S-CDK Kinases. *Cell* 146, 80–91.
- Hentze, M.W., Castello, A., Schwarzl, T., and Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat. Publ. Gr.* 19, 327–341.
- Her, J., Ray, C., Altshuler, J., Zheng, H., and Bunting, S.F. (2018). 53BP1 Mediates ATR-Chk1 Signaling and Protects Replication Forks under Conditions of Replication Stress. *Mol. Cell. Biol.* 38, 1–17.
- Heyer, W. (2004). Recombination : Holliday Junction. *Curr. Biol.* 14, 56–58.
- Hockensmith, J.W., Kubasek, W.L., Vorachek, W.R., and Hippel, P.H. Von (1986). Laser Cross-linking of Nucleic Acids to Proteins. 261, 3512–3518.
- Hong, S. (2017). RNA Binding Protein as an Emerging Therapeutic Target for Cancer Prevention and Treatment. *J. Cancer Prev.* 22, 203–210.
- Hu, H., Du, L., Nagabayashi, G., Seeger, R.C., and Gatti, R.A. (2010). ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1506–1511.
- Hu, W., Lei, L., Xie, X., Huang, L., Cui, Q., Dang, T., Liu, G.L., Li, Y., Sun, X., and Zhou, Z. (2019a). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L facilitates recruitment of 53BP1 and BRCA1 at the DNA break sites induced by oxaliplatin in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 10.
- Hu, X., Ding, D., and Zhang, J. (2019b). Knockdown of lncRNA HOTAIR sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation through activating miR-218. *Biosci. Rep.* 0, 1–9.
- Iliakis, G., Murmann, T., and Soni, A. (2015). Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 793, 166–175.

- Im, J., Ki, S., Farina, A., Jung, D., Hurwitz, J., and Lee, J. (2009). Assembly of the Cdc45-Mcm2 – 7-GINS complex in human cells requires the Ctf4 / And-1 , RecQL4 , and Mcm10 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2–6.
- Isono, M., Niimi, A., Oike, T., Hagiwara, Y., Sato, H., Sekine, R., Yoshida, Y., Isobe, S.Y., Obuse, C., Nishi, R., et al. (2017). BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Rep.* 18, 520–532.
- Iwabuchi, K., Bartel, P.L., Li, B., Marraccino, R., and Fields, S. (1994). Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6098–6102.
- Jager, M. De, Noort, J. Van, Gent, D.C. Van, Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2001). Human Rad50 / Mre11 Is a Flexible Complex that Can Tether DNA Ends. *Mol. Cell* 8, 1129–1135.
- Jain, R., Aggarwal, A.K., and Rechkoblit, O. (2018). Eukaryotic DNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 53, 77–87.
- Järvelin, A.I., Noerenberg, M., Davis, I., and Castello, A. (2016). The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Commun. Signal.* 14.
- Jensen, S., and Thomsen, A.R. (2012). Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. *J. Virol.* 86, 2900–2910.
- Jeong, S. (2017). SR Proteins : Binders , Regulators , and Connectors of RNA. 40, 1–9.
- Johansson, E., and Dixon, N. (2013). Replicative DNA Polymerases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
- Johnson, K.A. (2010). The kinetic and chemical mechanism of high-fidelity DNA polymerases. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 1041–1048.
- Jørgensen, S., Schotta, G., and Sørensen, C.S. (2013). Histone H4 Lysine 20 methylation: Key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res.* 41, 2797–2806.
- Jungmichel, S., Rosenthal, F., Altmeyer, M., Lukas, J., Hottiger, M.O., and Nielsen, M.L. (2013). Proteome-wide Identification of Poly (ADP-Ribosyl) ation Targets in Different Genotoxic Stress Responses. *Mol. Cell* 52, 272–285.
- Kais, Z., Rondinelli, B., Holmes, A., O’Leary, C., Kozono, D., D’Andrea, A.D., and Ceccaldi, R. (2016). FANCD2 Maintains Fork Stability in BRCA1/2-Deficient Tumors and Promotes Alternative End-Joining DNA Repair. *Cell Rep.* 15, 2488–2499.
- Kang, S., Kang, M.S., Ryu, E., and Myung, K. (2018). Eukaryotic DNA replication: Orchestrated action of multi-subunit protein complexes. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 809, 58–69.
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., and Lahav, G. (2012). Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. *Mol. Cell* 47, 320–329.
- Kawai, S., and Amano, A. (2012). BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *J. Cell Biol.* 197, 201–208.
- Keskin, H., Shen, Y., Huang, F., Patel, M., Yang, T., Ashley, K., Mazin, A. V., and Storici, F. (2014). Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair. *Nature* 515, 436–439.
- Kilic, S., Lezaja, A., Gatti, M., Bianco, E., Michelena, J., Imhof, R., and Altmeyer, M. (2019). Phase separation of 53BP 1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments . *EMBO J.* 38, 1–17.
- Kim, C., Kang, D., Lee, E.K., and Lee, J.S. (2017). Long noncoding RNAs and RNA-binding proteins in oxidative

- stress, cellular senescence, and age-related diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017.
- Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Jr, R.P., Yang, X., Galban, S., Srikantan, S., Martindale, J.L., Blethrow, J., Shokat, K.M., et al. (2008). Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. *Genes Dev.* 1804–1815.
- Kim, H.H., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2010). Regulation of HuR by DNA Damage Response Kinases. *J. Nucleic Acids.*
- Kim, Y., Lach, F.P., Desetty, R., Hanenberg, H., Auerbach, A.D., and Smogorzewska, A. (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 43, 142–146.
- KOTAKE, Y., GOTO, T., NAEMURA, M., INOUE, Y., OKAMOTO, H., and TAHARA, K. (2017). Long Noncoding RNA PANDA Positively Regulates Proliferation of Osteosarcoma Cells. *Anticancer Res.* 37, 81–86.
- Kramara, J., Osia, B., and Malkova, A. (2018). Break-Induced Replication : The Where , The Why , and The How. *Trends Genet.* 34, 518–531.
- Krietsch, J., Caron, M.C., Gagné, J.P., Ethier, C., Vignard, J., Vincent, M., Rouleau, M., Hendzel, M.J., Poirier, G.G., and Masson, J.Y. (2012). PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 40, 10287–10301.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610.
- Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. (2010). Treslin Collaborates with TopBP1 in Triggering the Initiation of DNA Replication. *Cell* 140, 349–359.
- Kwon, S.C., Yi, H., Eichelbaum, K., Föhr, S., Fischer, B., You, K.T., Castello, A., Krijgsveld, J., Hentze, M.W., and Kim, V.N. (2013). The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20.
- Lamaa, A., Bras, M. Le, Skuli, N., Britton, S., Frit, P., Calsou, P., Prats, H., Cammas, A., and Millevoi, S. (2016). A novel cytoprotective function for the DNA repair protein Ku in regulating p 53 mRNA translation and function. *EMBO Rep.* 17, 508–518.
- Lee, F.C.Y., and Ule, J. (2018). Advances in CLIP Technologies for Studies of Protein-RNA Interactions. *Mol. Cell* 69, 354–369.
- Lee, J., and Paull, T.T. (2005). ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science* (80-).
- Lemaitre, C., Grabarz, A., Tsouroula, K., Andronov, L., Furst, A., Pankotai, T., Heyer, V., Rogier, M., Attwood, K.M., Kessler, P., et al. (2014). Nuclear position dictates DNA repair pathway choice. *Genes Dev.* 2450–2463.
- Li, G.M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18, 85–98.
- Li, J., and Xu, X. (2016). DNA double-strand break repair: A tale of pathway choices. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 48, 641–646.
- Li, X., and Manley, J.L. (2005). New talents for an old acquaintance: The SR protein splicing factor ASF/SF2 functions in the maintenance of genome stability. *Cell Cycle* 4, 1706–1708.
- Li, J., Ji, X.Y., Wu, C., Yazinski, S.A., Nguyen, H.D., Jin, J., Zou, L., Liu, S., and Jime, A.E. (2014). PRP19 Transforms into a Sensor of RPA-ssDNA after DNA Damage and Drives ATR Activation via a Ubiquitin-Mediated Circuitry. *Mol. Cell* 235–246.

- Li, Z., Zhang, W., Chen, Y., Guo, W., Zhang, J., Tang, H., Xu, Z., Zhang, H., Tao, Y., Wang, F., et al. (2016). Impaired DNA double-strand break repair contributes to the age-associated rise of genomic instability in humans. *Cell Death Differ.* 1765–1777.
- Lieber, M.R. (1997). The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic dna replication, recombination and repair. *BioEssays.*
- Lieber, M.R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA End joining. *J. Biol. Chem.* 283, 1–5.
- Lloyd, J., Chapman, J.R., Clapperton, J.A., Haire, L.F., Hartsuiker, E., Li, J., Carr, A.M., Jackson, S.P., and Smerdon, S.J. (2009). A Supramodular FHA / BRCT-Repeat Architecture Mediates Nbs1 Adaptor Function in Response to DNA Damage. *Cell* 139, 100–111.
- Lopez-Martinez, D., Liang, C.C., and Cohn, M.A. (2016). Cellular response to DNA interstrand crosslinks: the Fanconi anemia pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3097–3114.
- Lottersberger, F., Bothmer, A., Robbiani, D.F., Nussenzweig, M.C., and Lange, T. De (2013). Role of 53BP1 oligomerization in regulating double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 2–7.
- Lu, X., and Legerski, R.J. (2007). The Prp19 / Pso4 core complex undergoes ubiquitylation and structural alterations in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 968–974.
- Lujan, S.A., Williams, J.S., and Kunkel, T.A. (2016). Eukaryotic genome instability in light of asymmetric DNA replication. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 9238, 43–52.
- Lukong, K.E., Chang, K., and Khandjian, E.W. (2008). RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet.*
- Mahajan, K.N., and Mitchell, B.S. (2003). Role of human Pso4 in mammalian DNA repair and association with terminal deoxynucleotidyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Mailand, N., Bekker-jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., and Lukas, C. (2007). RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell* 887–900.
- Malbert-colas, L., Ponnuswamy, A., Olivares-illana, V., Tournillon, A., and Naski, N. (2007). HDMX Folds the Nascent p53 mRNA following Activation by the ATM Kinase. *Mol. Cell.*
- Mamouni, K., Cristini, A., Guirouilh-barbat, J., Monferran, S., Lemarié, A., and Faye, J. (2014). RhoB Promotes gammaH2AX Dephosphorylation and DNA Double-Strand Break Repair. *34*, 3144–3155.
- Mansour, W.Y., Rhein, T., and Dahm-Daphi, J. (2010). The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res.* 38, 6065–6077.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst).* 7, 1765–1771.
- March, M. De, Merino, N., Barrera-vilarmau, S., Crehuet, R., Onesti, S., Blanco, F.J., and Biasio, A. De (2017). Structural basis of human PCNA sliding on DNA. *Nat. Commun.* 8, 1–7.
- Maris, C., and Dominguez, C. (2005). The RNA recognition motif , a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J.* 272, 2118–2131.
- 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.

- Mastrocola, A.S., Kim, S.H., Trinh, A.T., Rodenkirch, L.A., and Tibbetts, R.S. (2013). The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* *288*, 24731–24741.
- Masuda, K., Abdelmohsen, K., Kim, M.M., Srikantan, S., Lee, E.K., Tominaga, K., Selimyan, R., Martindale, J.L., Yang, X., Lehmann, E., et al. (2011). Global dissociation of HuR – mRNA complexes promotes cell survival after ionizing radiation. *EMBO J.* *30*, 1040–1053.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., Iii, E.R.M., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science* (80-.). *316*, 1160–1167.
- Mattioli, F., Vissers, J.H.A., Dijk, W.J. Van, Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., Marteijn, J.A., and Sixma, T.K. (2012). RNF168 Ubiquitinates K13-15 on H2A / H2AX to Drive DNA Damage Signaling. *Cell* *150*, 1182–1195.
- Mazan-Mamczarz, K., Galban, S., Lopez de Silanes, I., L. Martindale, J., Atasoy, U., D.Keene, J., and Gorospe, M. (2003). RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Mcelhinny, S.A.N., Havener, J.M., Garcia-diaz, M., Juárez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A., Ramsden, D.A., Hill, C., et al. (2005). A Gradient of Template Dependence Defines Distinct Biological Roles for Family X Polymerases in Nonhomologous End Joining University. *Mol. Cell* *19*, 357–366.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.*
- Mersaoui, S.Y., Masson, J., Yu, Z., Coulombe, Y., Karam, M., Busatto, F.F., and Richard, S. (2019). Arginine methylation of the DDX5 helicase RGG/RG motif by PRMT5 regulates resolution of RNA:DNA hybrids. *EMBO J.* *1*–20.
- Mersch, J., Jackson, M.A., Park, M., Nebgen, D., Peterson, S.K., Singletary, C., Arun, B.K., and Litton, J.K. (2015). Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer* *121*, 269–275.
- Michelini, F., Pitchiaya, S., Vitelli, V., Sharma, S., Gioia, U., Pessina, F., Cabrini, M., Wang, Y., Capozzo, I., Iannelli, F., et al. (2017a). Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1400–1411.
- Michelini, F., Pitchiaya, S., Vitelli, V., Sharma, S., Gioia, U., Pessina, F., Cabrini, M., Wang, Y., Capozzo, I., Iannelli, F., et al. (2017b). Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1400–1411.
- Michelini, F., Jaliha, A.P., Francia, S., Meers, C., Neeb, Z.T., Rossiello, F., Gioia, U., Aguado, J., Jones-Weinert, C., Luke, B., et al. (2018). From “Cellular” RNA to “Smart” RNA: Multiple Roles of RNA in Genome Stability and Beyond. *Chem. Rev.* *118*, 4365–4403.
- Mimori, T., and Hardin, J.A. (1986). Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J. Biol. Chem.* *261*, 10375–10379.
- Modrich, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair.
- Morozumi, Y., Takizawa, Y., Takaku, M., and Kurumizaka, H. (2009). Human PSF binds to RAD51 and modulates its homologous-pairing and strand-exchange activities. *Nucleic Acids Res.* *37*, 4296–4307.

- Moskwa, P., Buffa, F.M., Pan, Y., Panchakshari, R., Gottipati, P., Muschel, R.J., Beech, J., Kulshrestha, R., Abdelmohsen, K., Weinstock, D.M., et al. (2011). MiR-182-Mediated Downregulation of BRCA1 Impacts DNA Repair and Sensitivity to PARP Inhibitors. *Mol. Cell* *41*, 210–220.
- Murigneux, V., Saulière, J., Roest Crollius, H., and Le Hir, H. (2013). Transcriptome-wide identification of RNA binding sites by CLIP-seq. *Methods* *63*, 32–40.
- Nam, E.A., and Cortez, D. (2011). ATR signalling : more than meeting at the fork. *Biochem. J.* *536*, 527–536.
- Naski, N., Gajjar, M., Bourougaa, K., Malbert-colas, L., Fåhraeus, R., Candeias, M.M., Naski, N., Gajjar, M., Bourougaa, K., Malbert-colas, L., et al. (2009). The p53 mRNA-Mdm2 interaction. *Cell Cycle* *4101*.
- Neduva, V., and Russell, R.B. (2005). Linear motifs : Evolutionary interaction switches. *FEBS* *579*, 3342–3345.
- Neelsen, K.J., and Lopez, M. (2015). Replication fork reversal in eukaryotes : from dead end to dynamic response. *Mol. Cell. Biol.* *16*.
- Neelsen, K.J., Zanini, I.M.Y., Herrador, R., and Lopes, M. (2013). Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of processing of unusual replication intermediates. *J. Biol. Chem.* *200*, 699–708.
- 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.
- Nishida, K., Kuwano, Y., Nishikawa, T., Masuda, K., and Rokutan, K. (2017). RNA binding proteins and genome integrity. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 3–5.
- Ochs, F., Somyajit, K., Altmeyer, M., Rask, M.B., Lukas, J., and Lukas, C. (2016). 53BP1 fosters fidelity of homology-directed DNA repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 714–721.
- Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S.M., Canny, M.D., Brun, C.M., Strecker, J., Escibano-Diaz, C., and Durocher, D. (2014). Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science* (80-). *344*, 189–193.
- Ozdilek, B.A., Thompson, V.F., Ahmed, N.S., White, C.I., Batey, R.T., and Schwartz, J.C. (2017). Intrinsically disordered RGG/RG domains mediate degenerate specificity in RNA binding. *Nucleic Acids Res.* *45*, 7984–7996.
- Öze, A.R., Miller, D.F., Öze, O.N., Fang, F., Liu, Y., Matei, D., Huang, T., and Nephew, K.P. (2016). NF- κ B-HOTAIR axis links DNA damage response , chemoresistance and cellular senescence in ovarian cancer. *Oncogene* *5350–5361*.
- Panier, S. (2013). Push back to respond better : regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. *Mol. Cell. Biol.* *14*.
- Panier, S., and Boulton, S.J. (2013). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 7–18.
- Panier, S., and Boulton, S.J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *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.
- Paull, T.T., and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre11 Facilitates Repair of DNA Double-

- Strand Breaks. *Mol. Cell* **1**, 969–979.
- Paull, T.T., and Lee, J. (2005). The Mre11 / Rad50 / Nbs1 Complex and Its Role as a DNA Double-Strand Extra Views ND SC. *Cell Cycle* **7**, 737–740.
- Paulsen, R.D., Soni, D. V., Wollman, R., Hahn, A.T., Yee, M.C., Guan, A., Hesley, J.A., Miller, S.C., Cromwell, E.F., Solow-Cordero, D.E., et al. (2009). A Genome-wide siRNA Screen Reveals Diverse Cellular Processes and Pathways that Mediate Genome Stability. *Mol. Cell* **35**, 228–239.
- Pessina, F., Giavazzi, F., Yin, Y., Gioia, U., Vitelli, V., Galbiati, A., Barozzi, S., Garre, M., Oldani, A., Flaus, A., et al. (2019). Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors. *Nat. Cell Biol.* **21**, 1286–1299.
- Petermann, E., and Helleday, T. (2010). Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 683–687.
- Petermann, E., Issaeva, N., Schultz, N., Helleday, T., and Lui, M. (2010). Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Mol. Cell* **4**, 492–502.
- Petruseva, I.O., Evdokimov, A.N., and Lavrik, O.I. (2014). Molecular Mechanism of Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Acta Naturae* **6**, 23–34.
- Petryk, N., Kahli, M., D’Aubenton-Carafa, Y., Jaszczyszyn, Y., Shen, Y., Silvain, M., Thermes, C., Chen, C.L., and Hyrien, O. (2016). Replication landscape of the human genome. *Nat. Commun.* **7**, 1–13.
- Petti, E., Buemi, V., Zappone, A., Schillaci, O., Broccia, P.V., Dinami, R., Matteoni, S., Benetti, R., and Schoeftner, S. (2019). SFPQ and NONO suppress RNA:DNA-hybrid-related telomere instability. *Nat. Commun.* **10**.
- Phan, A.T., Kuryavyi, V., Darnell, J.C., Serganov, A., Majumdar, A., Ilin, S., Raslin, T., Polonskaia, A., Chen, C., Clain, D., et al. (2011). Structure-function studies of FMRP RGG peptide recognition of an RNA duplex-quadruplex junction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 796–804.
- Piccinno, R., Minneker, V., and Roukos, V. (2019). 53BP1—DNA repair enters a new liquid phase. *EMBO J.* **38**, 1–3.
- Pilzecker, B., Buoninfante, O.A., and Jacobs, H. (2019). DNA damage tolerance in stem cells, ageing, mutagenesis, disease and cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* **47**, 7163–7181.
- Piwko, W., Mlejnkova, L.J., Mutreja, K., Ranjha, L., Stafa, D., Smirnov, A., Brodersen, M.M.L., Zellweger, R., Sturzenegger, A., Janscak, P., et al. (2016). The MMS 22 L – TONSL heterodimer directly promotes RAD 51 - dependent recombination upon replication stress. *EMBO J.* **35**, 2584–2601.
- Poole, L.A., and Cortez, D. (2017). Functions of SMARCAL1 , ZRANB3 , and HLTF in maintaining genome stability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **9238**.
- Pryde, F. (2005a). 53BP1 exchanges slowly at the sites of DNA damage and appears to require RNA for its association with chromatin. *J. Cell Sci.* **118**, 2043–2055.
- Pryde, F. (2005b). 53BP1 exchanges slowly at the sites of DNA damage and appears to require RNA for its association with chromatin. *J. Cell Sci.* **118**, 2043–2055.
- Queiroz, R.M.L., Smith, T., Villanueva, E., Marti-Solano, M., Monti, M., Pizzinga, M., Mirea, D.M., Ramakrishna, M., Harvey, R.F., Dezi, V., et al. (2019). Comprehensive identification of RNA–protein interactions in any

- organism using orthogonal organic phase separation (OOPS). *Nat. Biotechnol.* *37*, 169–178.
- Quinet, A., and Lemac, D. (2017). Replication Fork Reversal : Players and Guardians. *Mol. Cell* 2015–2018.
- Ranoa, D.R.E., Parekh, A.D., Pitroda, S.P., Huang, X., Darga, T., Wong, A.C., Huang, L., Andrade, J., Staley, J.P., Satoh, T., et al. (2016). Cancer therapies activate RIG-I-like receptor pathway through endogenous non-coding RNAs. *Oncotarget* *7*, 26496–26515.
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 819–824.
- Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M., et al. (2007). Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat. Genet.* *39*, 162–164.
- Reinhardt, H.C., Hasskamp, P., Schmedding, I., Morandell, S., Vugt, M.A.T.M. Van, Wang, X., Linding, R., Ong, S., Weaver, D., Carr, S.A., et al. (2009). DNA Damage Activates a Spatially Distinct Late Cytoplasmic Cell-Cycle Checkpoint Network Controlled by MK2-Mediated RNA Stabilization. *Mol. Cell* *40*, 34–49.
- Renkawitz, J. (2014). Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Reuter, M., Zelensky, A., Smal, I., Meijering, E., Cappellen, W.A. Van, Gruiter, H.M. De, Belle, G.J. Van, Royen, M.E. Van, Houtsmuller, A.B., Essers, J., et al. (2014). BRCA2 diffuses as oligomeric clusters with RAD51 and changes mobility after DNA damage in live cells. *J. Cell Biol.* *207*, 599–613.
- Rhind, N., and Russell, P. (2012). Signaling Pathways that Regulate Cell Division. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1–15*.
- Rickman, K., and Smogorzewska, A. (2019). Advances in understanding DNA processing and protection at stalled replication forks. *J. Cell Biol.* *218*, 1096–1107.
- Roy, S., Luzwick, J.W., and Schlacher, K. (2018). SIRF: Quantitative in situ analysis of protein interactions at DNA replication forks. *J. Cell Biol.* *217*, 1553.
- Saldivar, J.C., Cortez, D., and Cimprich, K.A. (2017). The essential kinase ATR : ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Salem, E.S.B., Vonberg, A.D., Borra, V.J., Gill, R.K., and Nakamura, T. (2019). RNAs and RNA-Binding Proteins in Immuno-Metabolic Homeostasis and Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* *6*, 1–19.
- Savage, K.I., and Harkin, D.P. (2015). BRCA1 , a ‘ complex ’ protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS J.* *282*, 630–646.
- Scha, O.D. (2013). Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1–19*.
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., and Jasin, M. (2011). Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11. *Cell* *145*, 529–542.
- Schlacher, K., Wu, H., Jasin, M., Wu, H., and Jasin, M. (2012). A Distinct Replication Fork Protection Pathway. *Cancer Cell* *22*, 106–116.
- Sengupta, S., Robles, A.I., Linke, S.P., Sinogeeva, N.I., Zhang, R., Pedoux, R., Ward, I.M., Celeste, A., Nussenzweig, A., Chen, J., et al. (2004). Functional interaction between BLM helicase and 53BP1 in a Chk1-mediated pathway during S-phase arrest. *J. Cell Biol.* *166*, 801–813.

- Shaltiel, I.A., Krenning, L., and Bruinsma, W. (2015). The same , only different – DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J. Cell Sci.* 2, 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.
- Sharma, V., Khurana, S., Kubben, N., Abdelmohsen, K., Oberdoerffer, P., Gorospe, M., and Misteli, T. (2015). A BRCA1-interacting lncRNA regulates homologous recombination. *EMBO Rep.* 16, 1520–1534.
- Shchepachev, V., Bresson, S., Spanos, C., Petfalski, E., Fischer, L., Rappsilber, J., and Tollervey, D. (2019). Defining the RNA interactome by total RNA- associated protein purification. *Mol. Syst. Biol.* 1–23.
- Shin, K.H., Kim, R.H., Kang, M.K., Kim, R.H., Kim, S.G., Lim, P.K., Yochim, J.M., Baluda, M.A., and Park, N.H. (2007). p53 promotes the fidelity of DNA end-joining activity by, in part, enhancing the expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G. *DNA Repair (Amst).* 6, 830–840.
- 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.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., and Dreyfuss, G. (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionary conserved motif. *Nucleic Acids Res.* 21, 1193–1198.
- Sirbu, B.M., Couch, F.B., Feigerle, J.T., Bhaskara, S., and Hiebert, S.W. (2011). Analysis of protein dynamics at active , stalled , and collapsed replication forks. *Genes Dev.* 1320–1327.
- Sishc, B.J., and Davis, A.J. (2017). The Role of the Core Non-Homologous End Joining Factors in Carcinogenesis and Cancer. *MDPI*.
- Skourti-Stathaki, K. (2014). A double-edged sword : R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes Dev.* 1384–1396.
- Smith, K.C., and Meun, D.H.C. (1968). Kinetics of the Photochemical Addition of [35S] Cysteine to Polynucleotides and Nucleic Acids. *Biochemistry* 7, 1033–1037.
- Soni, A., Siemann, M., Grabos, M., Murmann, T., Pantelias, G.E., and Iliakis, G. (2014). Requirement for Parp-1 and DNA ligases 1 or 3 but not of Xrcc1 in chromosomal translocation formation by backup end joining. *Nucleic Acids Res.* 42, 6380–6392.
- Steen, H., Petersen, J., Mann, M., and Jensen, O.L.E.N. (2001). Mass spectrometric analysis of a UV-cross-linked protein – DNA complex : Tryptophans 54 and 88 of E . coli SSB cross-link to DNA. *Protein Sci.* 1989–2001.
- Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., and Medzhitov, R. (2008). Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. *Cell* 587–598.
- Stewart, G.S. (2009). Solving the RIDDLE of 53BP1 recruitment to sites of damage Solving the RIDDLE of 53BP1 recruitment to sites of damage. *4101*.
- Storici, F., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Gordenin, D.A., and Resnick, M.A. (2007). RNA-templated DNA repair. *Nature* 447, 338–342.
- Su, M., Wang, H., Wang, W., Wang, Y., Ouyang, L., Pan, C., Xia, L., Cao, D., and Liao, Q. (2018). LncRNAs in DNA damage response and repair in cancer cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 50, 433–439.
- Sutherland, L.C., Rintala-Maki, N.D., White, R.D., and Morin, C.D. (2005). RNA Binding Motif (RBM) proteins: A

- novel family of apoptosis modulators? *J. Cell. Biochem.* *94*, 5–24.
- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* *460*, 529–533.
- Sy, S.M.H., Huen, M.S.Y., and Chen, J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*.
- Szostak, J.W., Orr-weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). The Double-Strand-Break Repair Model for Recombination. *Cell* *33*, 25–35.
- Taglialatela, A., Alvarez, S., Leuzzi, G., Sannino, V., Ranjha, L., Huang, J.W., Madubata, C., Anand, R., Levy, B., Rabadan, R., et al. (2017). Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers. *Mol. Cell* *68*, 414-430.e8.
- Takebayashi, S., Ogata, M., and Okumura, K. (2017). Anatomy of Mammalian Replication Domains.
- Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G., and Hermeking, H. (2007). Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G 1-arrest. *Cell Cycle* *6*, 1586–1593.
- Thandapani, P., O'Connor, T.R., Bailey, T.L., and Richard, S. (2013). Defining the RGG/RG Motif. *Mol. Cell* *50*, 613–623.
- Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., and Narita, T. (2015). Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature*.
- Thu, Y.M., and Bielinsky, A. (2013). Enigmatic roles of Mcm10 in DNA replication. *Trends Biochem. Sci.* *38*, 184–194.
- Ting, N.S.Y., Yu, Y., Pohorelic, B., Lees-Miller, S.P., and Beattie, T.L. (2005). Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Res.* *33*, 2090–2098.
- Tischkowitz, M.D., and Hodgson, S. V (2003). Fanconi anaemia. *Genet. Predisposition to Cancer, Second Ed.* 180–192.
- Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* *155*, 1088.
- Tomba, P., Fuxreiter, M., Oldfield, C.J., Simon, I., Dunker, A.K., and Uversky, V.N. (2009). Close encounters of the third kind : disordered domains and the interactions of proteins. *BioEssays* 328–335.
- Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A.D., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* *459*, 1010–1014.
- Trendel, J., Schwarzl, T., Horos, R., Prakash, A., Bateman, A., Hentze, M.W., and Krijgsveld, J. (2018). The Human RNA-Binding Proteome and Its Dynamics during Translational Arrest. *Cell* *176*, 1–33.
- Trendel, J., Schwarzl, T., Horos, R., Prakash, A., Bateman, A., Hentze, M.W., and Krijgsveld, J. (2019). The Human RNA-Binding Proteome and Its Dynamics during Translational Arrest. *Cell* *176*, 391-403.e19.
- Tripathi, V., Nagarjuna, T., and Sengupta, S. (2007). BLM helicase-dependent and -independent roles of 53BP1 during replication stress-mediated homologous recombination. *J. Cell Biol.* *178*, 9–14.

- Tuduri, S., Crabbé, L., Conti, C., Tourrière, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantesco, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., et al. (2009). Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1315–1324.
- Ule, J., Jensen, K.B., Ruggiu, M., and Mele, A. (2003). CLIP Identifies Nova-Regulated RNA Networks in the Brain. *Science* (80-). *302*, 1212–1216.
- Ule, J., Jensen, K., Mele, A., and Darnell, R.B. (2005). CLIP : A method for identifying protein – RNA interaction sites in living cells. *Methods* *37*, 376–386.
- Uversky, V.N. (2019). Intrinsically Disordered Proteins and Their “ Mysterious ” (Meta) Physics. *7*, 8–23.
- Valverde, R., Edwards, L., and Regan, L. (2008). Structure and function of KH domains. *275*, 2712–2726.
- Varadi, M., Zsolyomi, F., Guharoy, M., and Tompa, P. (2015). Functional Advantages of Conserved Intrinsic Disorder in RNA-Binding Proteins. *PLoS One* 1–16.
- Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T.J., and Walter, J.C. (2003). Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev.* 1894–1908.
- Vasilyev, N., Polonskaia, A., Darnell, J.C., Darnell, R.B., and Patel, D.J. (2015). Crystal structure reveals specific recognition of a G-quadruplex RNA by a β -turn in the RGG motif of FMRP. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Vesela, E., Chroma, K., Turi, Z., and Mistrik, M. (2017). Common chemical inductors of replication stress: Focus on cell-based studies. *Biomolecules* *7*.
- Villa, M., Bonetti, D., Carraro, M., and Longhese, M.P. (2018). Rad9/53BP1 protects stalled replication forks from degradation in Mec1/ATR-defective cells. *EMBO Rep.* *19*, 351–367.
- Vítor, A.C., Sridhara, S.C., Sabino, J.C., Afonso, A.I., Grosso, A.R., Martin, R.M., and De Almeida, S.F. (2019). Single-molecule imaging of transcription at damaged chromatin. *Sci. Adv.* *5*.
- Waga, S., and Stillman, B. (1998). THE DNA REPLICATION FORK IN EUKARYOTIC CELLS. *Annu. Rev. Biochem.*
- Wan, L., and Huang, J. (2014). The PSO4 Protein Complex Associates with Replication Protein A (RPA) and Modulates the Activation of Ataxia Telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR). *J. Biol. Chem.* *289*, 6619–6626.
- Wang, B., and Elledge, S.J. (2007). Ubc13 / Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80 / Abraxas / Brca1 / Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*.
- Wang, L.C., and Gautier, J. (2010). The Fanconi anemia pathway and ICL repair: Implications for cancer therapy. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *45*, 424–439.
- Wang, A.T., Kim, T., John, E., Auerbach, A.D., Kowalczykowski, S.C., Wang, A.T., Kim, T., Wagner, J.E., Conti, B.A., Lach, F.P., et al. (2015). A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Mol. Cell* *59*, 478–490.
- Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M.C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N., and Gorospe, M. (2000). HuR Regulates p21 mRNA Stabilization by UV Light. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 760–769.
- Wei, W., Ba, Z., Gao, M., Wu, Y., Ma, Y., Amiard, S., White, C.I., Danielsen, J.M.R., Yang, Y.G., and Qi, Y. (2012). A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell* *149*, 101–112.
- Weiss, S., Gekara, N.O., Erttmann, S.F., Raffi, F.A.M., Schmalz, A.M., and Resch, U. (2015). DNA Damage Primes the Type I Interferon System via the Cytosolic DNA Sensor STING to Promote Anti- Microbial Innate

- Immunity. 332–343.
- Welty, S., Teng, Y., Liang, Z., Zhao, W., Sanders, L.H., Greenamyre, J.T., Rubio, M.E., Thathiah, A., Kodali, R., Wetzel, R., et al. (2018). RAD52 is required for RNA-templated recombination repair in post-mitotic neurons. *J. Biol. Chem.* 293, 1353–1362.
- Williams, R.S., Dodson, G.E., Limbo, O., Yamada, Y., Williams, J.S., Guenther, G., Classen, S., Glover, J.N.M., Iwasaki, H., Russell, P., et al. (2009). Nbs1 Flexibly Tethers Ctp1 and Mre11- Rad50 to Coordinate DNA Double-Strand Break Processing and Repair. *Cell* 139, 87–99.
- Wu, M., Lu, W., Santos, R.E., Frattini, M.G., and Kelly, T.J. (2014). Geminin Inhibits a Late Step in the Formation of Human Pre-replicative Complexes *. *J. Biol. Chem.* 289, 30810–30821.
- Xia, B., Dorsman, J.C., Ameziane, N., De Vries, Y., Roomans, M.A., Sheng, Q., Pals, G., Errami, A., Gluckman, E., Llera, J., et al. (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat. Genet.* 39, 159–161.
- Xiang, S., Gapsys, V., Kim, H., Bessonov, S., Hsiao, H., Mo, S., Klaukien, V., Ficner, R., Becker, S., Urlaub, H., et al. (2013). Phosphorylation Drives a Dynamic Switch in Serine / Arginine-Rich Proteins. *Structure* 1, 2162–2174.
- Xie, A., Kwok, A., and Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 814–818.
- Xu, Y., Ning, S., Wei, Z., Xu, R., Xu, X., Xing, M., Guo, R., and Xu, D. (2017). 53BP1 and BRCA1 control pathway choice for stalled replication restart. *Elife* 6, 1–24.
- Yan, J., and Jetten, A.M. (2008). RAP80 and RNF8 , key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites. *Cancer Lett.* 271, 179–190.
- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478–482.
- Yang, Y., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2007). Trex1 Exonuclease Degrades ssDNA to Prevent Chronic Checkpoint Activation and Autoimmune Disease. *Cell* 873–886.
- Zaher, M.S., Rashid, F., Song, B., Joudeh, L.I., Sobhy, M.A., Tehseen, M., Hingorani, M.M., and Hamdan, S.M. (2018). Missed cleavage opportunities by FEN1 lead to Okazaki fragment maturation via the long-flap pathway. *Nucleic Acids Res.* 46, 2956–2974.
- Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., and Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *J. Cell. Biochem.* 208, 563–579.
- Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* 16.
- Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., Yu, X., Place, Z.P., and Arbor, A. (2009). PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response. *Curr. Biol.* 19, 524–529.
- Zhang, X., Wan, G., Berger, F.G., He, X., and Lu, X. (2011). The ATM Kinase Induces MicroRNA Biogenesis in the DNA Damage Response. *Mol. Cell* 41, 371–383.
- Zhang, Y., He, Q., Hu, Z., Feng, Y., Fan, L., Tang, Z., Yuan, J., Shan, W., Li, C., Hu, X., et al. (2016). Long noncoding

- RNA LINC1 regulates repair of DNA double-strand breaks in triple-negative breast cancer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 522–530.
- Zhang, Z., Zhu, L., Lin, D., Chen, F., Chen, D.J., and Chen, Y. (2001). The Three-dimensional Structure of the C-terminal DNA-binding Domain of Human Ku70 *. *J. Biol. Chem.* 276, 38231–38236.
- Zheng, L., Dai, H., Zhou, M., Li, M., Singh, P., Qiu, J., Tsark, W., Huang, Q., Kernstine, K., Zhang, X., et al. (2007). Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers. *Nat. Med.* 13, 812–820.
- Zheng, L., Dai, H., Hegde, M.L., Zhou, M., Guo, Z., Wu, X., Wu, J., and Su, L. (2011). Fen1 mutations that specifically disrupt its interaction with PCNA cause aneuploidy-associated cancer. *Nat. Publ. Gr.* 21, 1052–1067.
- Zheng, L., Meng, Y., Campbell, J.L., and Shen, B. (2019). Multiple roles of DNA2 nuclease / helicase in DNA metabolism, genome stability and human diseases. *Nucleic Acids Res.* 1–20.
- Zhou, C., Pourmal, S., and Pavletich, N.P. (2015). Dna2 nuclease-helicase structure, mechanism and regulation by Rpa. *Elife* 1–19.
- Zimmermann, M., and De Lange, T. (2014). 53BP1: Pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol.* 24, 108–117.

ANNEXES

ANNEXE N°1

CLIP (« CrossLinking and ImmunoPrecipitation ») + extraction des acides nucléiques

d'après Murigneux et al., 2013

Avant-propos :

Dans les cellules, l'ARN est associé à de nombreuses protéines assurant des fonctions nucléaires et cytoplasmiques diverses afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. Le CLIP est initialement proposé en tant que stratégie robuste pour l'identification des sites de liaison de l'ARN à la protéine d'intérêt, l'avantage étant que la liaison entre la protéine et l'ARN ont lieu dans un contexte physiologique (i.e. culture cellulaire). De plus, le couplage covalent aux UV-C à 254 nm qui crée des liaisons covalentes entre les bases nucléotidiques de l'ARN et les acides aminés de la protéine d'intérêt permet l'application de conditions de lavages très stringents (haute teneur en sels, utilisation d'agents dénaturant...) après l'immunoprécipitation, ce qui rend cette méthode très spécifique contrairement à la technique de RIP (« RNA immunoprecipitation ») classique, qui n'utilise pas de couplage covalent aux UV-C. Dans notre cas, nous n'avons pas cherché à déterminer spécifiquement les sites de liaison à l'ARN de 53BP1 mais plutôt à connaître la nature de l'ARN lié à 53BP1. Ainsi, le protocole ci-dessous détaille les différentes étapes à suivre et conseils à appliquer pour réaliser le CLIP ainsi que l'extraction des acides nucléiques qui s'en suit (les grandes lignes du protocole sont résumées dans la figure 2).

MATERIELS

➤ **Réactifs**

- ATP, [γ -³²P]- 3000Ci/mmol 10mCi/ml EasyTide (PerkinElmer, cat. no. BLU502A250UC)
- Anticorps lapin anti-53BP1 polyclonal (Bethyl Laboratories, cat. no. A300-272A)
- Cocktail inhibiteur de protéases (Roche, cat. no. 11836170001)
- DMEM high-glucose (Biowest, cat. no. L0101-500)
- EDTA (0.5 M), pH 8.0 (Invitrogen, cat. no. AM9260G)
- Éthanol absolu \geq 99.8% (VWR, cat. no. 20821.310)
- Gamme BSA pour le dosage BCA (Biorad, cat. no. 500-0207)
- Gel TBE-urée 6% (Invitrogen, cat. no. EC6865BOX)
- GlycoBlue™ Coprecipitant (15 mg/mL) (Invitrogen, cat. no. AM9515)
- H₂O distillée ultrapure DNase/RNase free (Invitrogen, cat. no. 10977-035)
- IGEPAL® CA-630 (NP-40) (Sigma, cat. no. I3021)
- LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen, cat. no. NP0007)
- MgCl₂ 1M (Invitrogen, cat. no. AM9530G)
- MOPS SDS Running Buffer (20X) (Invitrogen, cat. no. NP0001)
- NaCl 5M (NaCl, Sigma-Aldrich, cat. no. S6546)
- PBS 1X (laverie)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 (Sigma, cat. no. P3803) **! ATTENTION** Produit hautement toxique (Cancérogène, Mutagène ou toxique pour la Reproduction : CMR)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, cat. no. 23225)
- Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Biorad, cat. no. 1610374)

- Proteinase K (Thermo Scientific, cat. no. E00491)
- RNase OUT (Invitrogen, cat. no. 10777019)
- RNase A (Thermo Scientific, cat. no. EN0531)
- Sample Reducing Agent 10X (Invitrogen, cat. no. NP0004)
- SDS en solution, 10% (Invitrogen, cat. no. 15553035)
- Sodium Acetate (3 M), pH 5.5 (Invitrogen, cat. no. AM9740)
- Sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich, cat. no. 30970)
- T4 Polynucleotide Kinase (Thermo Scientific, cat. no. EK0032)
- Tampon LDS 1X (voir composition)
- Tampon de lyse RIPA (voir composition)
- Tampon PK (voir composition)
- Tampon PK-urée (voir composition)
- Tampon PNK (voir composition)
- Tampon RIPA-S (voir composition)
- TBE-urea sample buffer (2X) (Invitrogen, cat. no. LC6876)
- TBE 10X (Euromedex, cat. no. ET020) **! ATTENTION** Le TBE contient de l'acide borique, un agent hautement toxique, il est donc à manipuler avec précaution
- Transfert buffer 20X (Invitrogen, cat. no. NP0006-1)
- Tris-HCl 1M pH 7,5 (Invitrogen, cat. no. 15567027)
- TURBO™ DNase (Invitrogen, cat. no. AM2238)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, cat. no. P7949)

➤ **Composition des tampons**

! ATTENTION Les tampons sont à filtrer avant leur utilisation. Toujours utiliser des pointes à filtres pour pipeter les différentes solutions.

• **Tampon LDS 1X**

Pour 400 µl : 100 µl LDS 4X + 40 µl Sample Reducing Agent (10X) + 260 µl tampon PNK

• **Tampon de lyse (RIPA)**

Réactifs	Concentration stock	Concentration finale	Volume à prélever
H ₂ O (QSP 500 ml)			455 ml
Tris-HCl pH 7,4	1 M	50 mM	25 ml
NaCl	5 M	100 mM	10 ml
IGEPAL CA630 (NP-40)	100%	1%	5 ml
SDS	10%	0,1%	5 ml
Sodium deoxycholate	poudre	0,5%	2,5 g

• **Tampon PK**

Réactifs	Concentration stock	Concentration finale	Volume à prélever
H ₂ O (QSP 15 ml)			13,05 ml
Tris-HCl pH 7,4	1 M	100 mM	1,5 ml
NaCl	5 M	50 mM	150 µl
EDTA	0,5 M	10 mM	300 µl

• **Tampon PK-urée**

Réactifs	Concentration stock	Concentration finale	Volume à prélever
H ₂ O (QSP 15 ml)			ml
Tris-HCl pH 7,4	1 M	100 mM	1,5 ml
NaCl	5 M	50 mM	150 µl
EDTA	0,5 M	10 mM	300 µl
Urée (poudre)	poudre	7 M	6,3 g

• **Tampon PNK**

Réactifs	Concentration stock	Concentration finale	Volume à prélever
H ₂ O (QSP 50 ml)			48,4 ml
Tris-HCl pH 7,4	1 M	20 mM	1 ml
MgCl ₂	1 M	10 mM	500 µl
Tween 20	100%	0,2 %	100 µl

• **Tampon RIPA-S**

Réactifs	Concentration stock	Concentration finale	Volume à prélever
H ₂ O			36,4 ml
Tris-HCl pH 7,4	1 M	50 mM	2,5 ml
NaCl	5 M	1 M	10 ml
EDTA	0,5 M	1 mM	100 µl
IGEPAL CA630 (NP-40)	100%	1%	500 µl
SDS	10%	0,1%	500 µl
Sodium deoxycholate	poudre	0,5%	250 mg

➤ **Equipements**

- Aimant DynaMag-2 (ThermoFisher Scientific, cat. no. 12321D)
- Boîtes de culture cellulaire, 145*20 mm, stériles (Greiner Bio-one, cat. no. 639160)
- Centrifugeuse (Eppendorf, cat. no. 5425)
- Dynabeads™ Protein G (Invitrogen, cat. no. 10009D)
- Ecran radioluminescent
- Film plastique Saran transparent
- Incubateur maintenant une atmosphère humide, 37°C et 5% de CO₂
- Grattoirs stériles (TPP, cat. no. 99002)
- Membrane de nitrocellulose 0,45 µm (VWR, cat. no. 10600002)
- Mini Trans-Blot® Cell (Biorad, cat. no. 1703930)
- NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10 puits (Invitrogen, cat. no. NP0321BOX)
- Papier Whatman
- Phase Lock Gel™ Heavy (VWR, cat. no. 733-2478)
- ThermoMixer Eppendorf (Eppendorf, cat. no. 5382000015)
- Stratalinker® UV Crosslinker, Model 1800, (stratagene, cat. no. 400072)

- Tubes 15 ml stériles (TPP, cat. no. 91015)
- Tubes 50 ml stériles (TPP, cat. no. 91050)
- Tubes Eppendorf 1,5 ml
- Typhoon
- Sécheur de gel (VWR, cat. no. 700-7124)
- XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen cat. no. EI0001)

PROCEDURE

❖ **Culture cellulaire et traitement aux UV • DUREE 2 à 3 jours**

1. Calculer le nombre de cellules **A2058** ou **HEK293** nécessaires pour l'expérience :

- la lignée cellulaire A2058 sert au CLIP endogène. Sans transfection de siRNA, planter 3 millions de cellules par boîte de culture 14 cm pour obtenir une confluence de 80% au bout de 48h. Compter 1 boîte pour la condition UV- et 2 boîtes pour la condition UV+. En cas de transfection pour 48h, planter 2 millions de cellules la veille de la transfection.

- la lignée cellulaire HEK293 est utilisée comme modèle de surexpression des protéines de fusion-GFP. La surexpression des protéines se fait *via* une transfection de plasmide classique (forward : le lendemain du plantage) à l'aide de l'agent de transfection JetPEI. Dans ce cas, planter 1,5 millions de cellules par boîte de culture 14 cm pour obtenir une confluence de 80% au bout de 72h. Compter 1 boîte pour la condition UV- et 2 boîtes pour la condition UV+.

2. Enlever le milieu des boîtes de culture, faire un lavage au PBS 1X froid (afin de retirer complètement le rouge phénol présent dans le milieu de culture, qui pourrait interférer l'action des UV-C) puis ajouter 5 ml de PBS froid **REMARQUE !** Après avoir sorti les boîtes de culture de l'incubateur, travailler sur la glace afin de prévenir l'action des RNAses qui pourraient dégrader les ARN présents dans l'échantillon.

3. Ôter le couvercle de la boîte de culture et la placer dans le stratalinker sur un bac de glace. Appliquer aux cellules les UV-C (254 nm) à raison de $4000 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ (soit $400 \text{ mJ}/\text{cm}^2$). Récupérer les cellules à l'aide d'un grattoir et les transférer dans un tube falcon 50 ml. **REMARQUE !** Pour contrôler la spécificité de la liaison ARN-protéine, faire un contrôle négatif sans traitement UV-C. **INFO** A cette dose, les UV-C permettent de « figer » les liaisons protéines-ARN présentent dans les cellules au moment de l'irradiation en créant des liaisons covalentes (très fortes) entre les bases nucléotidiques en contact étroit avec les acides aminés des protéines.

4. Centrifuger les tubes 5 minutes à 1500 rpm à 4°C puis éliminer le surnageant. **PAUSE** A ce stade, les culots peuvent être stockés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

◆ **ETAPE CRITIQUE** Toutes les étapes du CLIP nécessitent d'utiliser du matériel le plus stérile possible afin d'éviter toute dégradation involontaire des acides nucléiques présents dans l'échantillon.

❖ **Fixation des anticorps sur les billes magnétiques • DUREE 30 min à une nuit**

5. Un anticorps polyclonal de lapin anti-53BP1 est conjugué aux billes magnétiques (Dynabeads ProteinG). **REMARQUE !** Afin d'optimiser au maximum l'immunoprécipitation, il est recommandé d'effectuer des tests avec différentes concentrations de protéines et de billes magnétiques.

6. La quantité de billes nécessaire à l'expérience est transférée dans un tube Eppendorf, qui est ensuite placé sur une barre magnétique afin de retirer aisément le surnageant des billes. Celles-ci sont ensuite

lavées (par des pipetages par vas et viens) deux fois au PBS-T 0,02% puis mises à tourner sur roue 5 minutes à 4°C dans le tampon PBS-T 0,02% supplémenté en BSA à 100 µg/ml. **REMARQUE !** La BSA va permettre de bloquer les éventuels sites aspécifiques des billes magnétiques où pourrait se lier l'anticorps.

7. Laver trois fois les billes au PBS-T 0,02% sans BSA. **REMARQUE !** Afin d'optimiser au maximum l'immunoprécipitation, faire des tests avec différentes concentrations d'anticorps est recommandé, ainsi que le test IgG contrôle et le test sans anticorps.

8. Ajouter la solution d'anticorps aux billes magnétiques. Pour l'expérience, par condition, diluer dans 4 fois le volume de billes (4 X 50 µl) 5 µg d'anticorps. Les billes sont mises à tourner sur roue à 4°C pendant minimum 30 minutes et maximum une nuit. Les billes couplées à l'anticorps peuvent être conservé 24 heures maximum à 4°C.

❖ Lyse cellulaire • DUREE 2 heures

9. Resuspendre le culot cellulaire dans le **tampon de lyse RIPA** supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases ajouté extemporanément et d'anti-RNase (RNase OUT). Selon la taille du culot, le volume de resuspension sera différent. Par exemple, pour 2 boîtes de culture de 14 cm et une confluence cellulaire à 80%, compter 200 µl de tampon pour resuspendre le culot. Transférer dans un tube Eppendorf 1,5 ml.

10. Mettre le lysat cellulaire à tourner sur roue à 4°C pendant 1 heure maximum.

11. Soniquer les échantillons à l'aide d'un sonicateur à bain (couper l'eau avec de la glace) réglé de la façon suivante : 0,5' OFF ; 1' ON ; High intensity ; 5 minutes. **REMARQUE !** La sonication du lysat consiste en la destruction des cellules par les ultrasons, ainsi elle permet de finaliser la lyse et également de briser la chromatine agrégée dans l'échantillon.

12. Centrifuger à 12000 rpm pendant 20 minutes à 4°C, récupérer le surnageant dans un tube Eppendorf 1,5 ml puis procéder au dosage protéique (à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay).

❖ Immunoprécipitation, marquage radioactif des ARN et récupération des complexes ARN-protéine • DUREE Une nuit et 2 heures

13. Une fois la concentration protéique connue et les billes couplées aux anticorps lavées au PBS-T 0,02%, mettre 500 µg de protéines (concentrées à 1mg/ml dans du tampon de lyse= input) sur les billes et incubé une nuit à 4°C sous agitation **REMARQUE !** Sauvegarder 20 µl d'input avant le dépôt sur bille, ils seront utilisés en western blot afin de contrôler la quantité de protéines de départ déposée sur les billes.

14. Le lendemain, laver deux fois les billes au **tampon RIPA-S** froid et une fois au **tampon PNK** froid **INFO** Le tampon RIPA-S est riche en sels, il permet d'éliminer tout ce qui se serait lié de manière aspécifique aux billes ou à l'anticorps sans affecter la liaison covalente (très forte) entre la protéine d'intérêt et l'ARN. **REMARQUE !** Après le lavage des billes, sauvegarder 20 µl de billes + lysat (appelé IP), ils seront utilisés en western blot afin de contrôler la quantité de protéines immunoprécipitées par les billes.

15. Préparer le mix contenant la T4 polynucléotide kinase (T4 PNK) en la diluant au 20^{ème} dans le tampon PNK, son tampon B au 10^{ème} et le γ P³² au 40^{ème} **REMARQUE !** Le γ ³²P est ajouté juste avant la réaction, dans la pièce de radioactivité.

! ATTENTION Les prochaines étapes s'effectuent en pièce de radioactivité, il est donc important de travailler derrière un écran en plexiglass et de porter la bague et le dosimètre de poitrine.

16. Resuspendre les billes dans ce mix puis incuber 20-30 minutes à 37°C à 800 rpm (ThermoMixer)

INFO Ici la T4 PNK permet une réaction d'échange entre le phosphate de l'extrémité 5' des ARN ou ADN et le gamma-phosphate de l'ATP radioactif (réaction également appelée « exchange reaction » permise grâce au tampon A, contrairement au tampon B qui permet une réaction de transfert, également appelée réaction directe ou « forward reaction », voir figure 1).

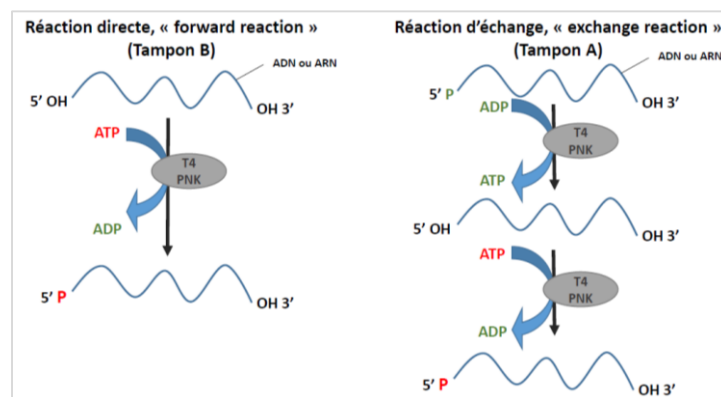


Figure 1 : Les 2 types d'action de la T4 polynucléotide kinase (T4 PNK) selon le tampon de réaction utilisé (A ou B)

17. Laver deux fois les billes au **tampon RIPA-S** froid et une fois au **tampon PNK** froid.

18. Eluer ensuite les complexes ARN-protéines avec 15 µl de LDS 1X

19. Dénaturer les échantillons 10 min à 80°C à 1000 rpm. **REMARQUE !** Faire chauffer et agiter fortement les billes va permettre de détacher le plus possible les anticorps des billes en plus de dénaturer les protéines pour leur migration correcte.

20. Vortexer et effectuer une centrifugation rapide puis récupérer le surnageant. **PAUSE** Les éluats peuvent être conservés à -20°C jusqu'à leur future utilisation.

❖ SDS-page et transfert des complexes ARN-protéine sur membrane de nitrocellulose

• DUREE 3 heures

21. Procéder à la migration SDS-PAGE. Charger 15 µl d'échantillon sur un gel à gradient 4-12% Bis-tris. Un puits est utilisé pour le dépôt du ladder protéique (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards).

22. Migrer à 150 V dans une cuve XCell SureLock Mini-Cell remplie de tampon MOPS 1X (fait à partir du MOPS SDS Running buffer 20X) jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. **REMARQUE !** Eviter de faire « sortir » le front de migration pour ne pas contaminer radioactivement le tampon MOPS.

PAUSE A ce stade, si les acides nucléiques ne sont pas extraits, le gel peut être mis sur deux feuilles de papier Whatman, recouvert de film Saran puis mis à sécher sous vide dans le sécheur de gel et enfin exposé sur un écran radioluminescent pour être lu à l'aide du Typhoon.

23. Transférer les échantillons du gel sur la membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert liquide (Mini Trans-Blot Cell) à 100 V pendant 2 heures dans le tampon de transfert 1X. Celui-ci est fait à partir du tampon de Transfert 20X additionné de 20% d'éthanol absolu).

REMARQUE ! 53BP1 est une protéine de haut poids moléculaire, un transfert liquide est donc privilégié ici.

24. Après le transfert, le ladder est marqué par des points radioactifs qui serviront plus tard, au moment du découpage de la membrane. La membrane est ensuite placée dans un film Saran et mise à exposer sur un écran radioluminescent pendant minimum 2 heures. L'écran est lu à l'aide du Typhoon.

❖ **Traitement protéinase K, purification des acides nucléiques et dépôt sur gel dénaturant • DUREE 1 nuit et 2 heures**

25. Découper (sur une plaque en verre « propre ») la membrane de nitrocellulose à l'aide d'un scalpel stérile puis placer le morceau dans un tube Eppendorf 1,5 ml afin de procéder à la purification des acides nucléiques. **REMARQUE !** Les points de radioactivité servent à repérer sur la membrane l'endroit (= taille de la protéine d'intérêt, ici 53BP1) où découper.

26. Pour la purification des acides nucléiques, ajouter 200 µl **tampon PK** auxquels viennent s'ajouter 10 µl de protéinase K. Incuber 20 minutes à 37°C et 1100 rpm. **INFO** La protéinase K est une protéase qui va dégrader les protéines présentes sur la membrane de nitrocellulose afin de libérer les acides nucléiques qu'elles lient. Pour cela, elle clive les liaisons peptidiques sur les côtés carboxyliques des acides aminés aliphatiques, aromatiques ou hydrophobes.

27. Au bout de 20 minutes, ajouter 200 µl de **tampon PK-urée**. **INFO** L'urée va dénaturer les substrats protéiques, augmentant l'efficacité de digestion de la protéinase K.

28. Les 410 µl totaux sont transférés dans un tube Phase Lock Gel puis un volume (410 µl) de phénol/chloroforme/alcool isoamylique sont ajoutés par-dessus **INFO** Les tubes Phase Lock Gel permettent de faciliter l'extraction des acides nucléiques et d'empêcher leur contamination interphase. **! ATTENTION** La manipulation du phénol/chloroforme/alcool isoamylique implique obligatoirement l'utilisation d'une hotte chimique.

28. Vortexer à 1100 rpm à 30°C puis centrifuger 5 minutes à 16000 rpm à température ambiante.

29. La phase aqueuse (du dessus) est collectée et transférée dans un tube Eppendorf 1,5 ml et les acides nucléiques sont précipités en ajoutant un mix de 40 µl de sodium acétate, 1 µl de glycoblue et 1 ml d'Ethanol 100%.

30. Placer le tube une nuit à -20°C.

31. Le lendemain, centrifuger 20 minutes à 20000 rpm à 4°C.

32. Enlever le surnageant et laver le culot avec 1 ml d'Ethanol 80%.

33. Laisser sécher rapidement le culot et le resuspendre dans 12 µl d'H₂O ultrapure.

34. Les 12 µl sont divisées en 3 tubes (contenant 4µl chacun). Le premier tube est additionné de 1 µl d'H₂O, le deuxième de 1 µl de RNase et le dernier de 1 µl DNase. Incuber 10 min à 37°C. **REMARQUE !** Ici, on se place dans des conditions où les enzymes sont en excès, digérant au maximum les acides nucléiques.

35. Ajouter le tampon de charge (TBE-urea sample buffer 2X) puis incuber 5 min à 80°C.

36. Procéder à la migration SDS-PAGE. Déposer sur gel dénaturant 6% TBE-urée les 10 µl d'échantillon. Le tampon de migration est du TBE 1X **REMARQUE !** De la même manière que pour le gel protéique,

un ladder est déposé dans un puits et des points de radioactivité pour repérer les différentes bandes permettrons de connaitre la taille des fragments nucléiques générés après digestion par les enzymes.

37. Après la migration, le gel est posé sur deux feuilles de papier Whatman et recouvert de film Saran pour être mis à sécher sous vide pendant 2 heures à 80°C. **REMARQUE !** Ne pas casser le vide avant que le gel ne soit bien sec par risque qu'il se craque.

38. Le gel sec est mis à exposer sur un écran radioluminescent pendant minimum 24 heures. L'écran est lu à l'aide du Typhoon.

J0: Ensemencement (facultatif: transfection siRNA)

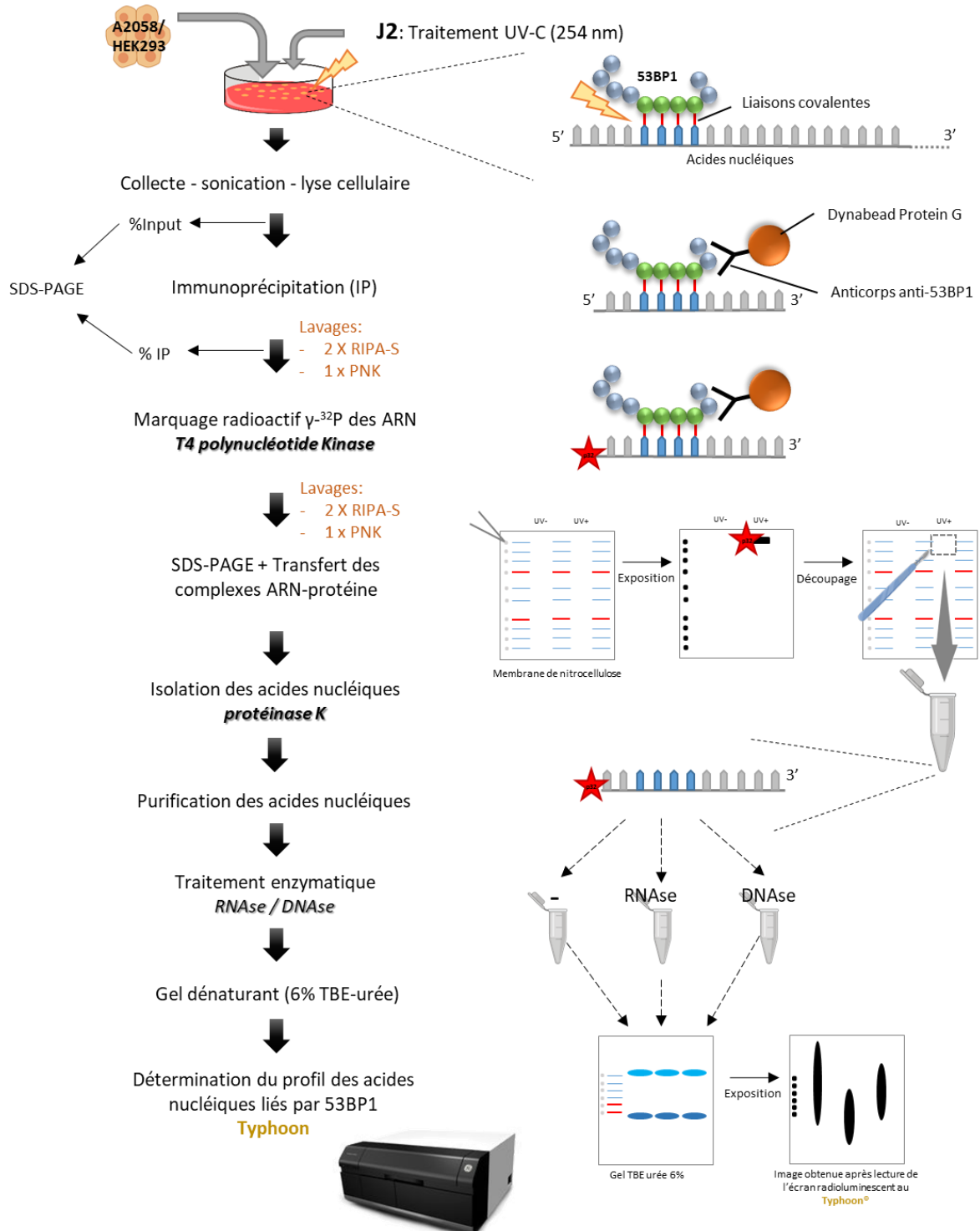


Figure 2: Protocole du CLIP

Les cellules sont irradiées aux UV-C (254 nm; 400 mJ/cm²), récoltées puis lysées. Le lysat cellulaire est appliqué à des billes magnétiques couplées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt (53BP1). 53BP1 est ainsi immunoprécipité. Après des lavages stringents, l'extrémité 5' des ARN liés à 53BP1 est marquée au γ -³²P grâce à la T4 polynucléotide kinase (PNK). La migration des complexes ARN-53BP1 par SDS-PAGE ainsi que leur migration sur membrane de nitrocellulose est effectuée. La membrane est découpée à l'endroit du signal radioactif et l'extraction des ARN s'en suit. Le profil des ARN liés à 53BP1 est déterminé après leur migration sur gel dénaturant TBE-urée 6%, séchage du gel et exposition sur écran radioluminescent.

ANNEXE N°2

2C (« Complex Capture ») d'après Asencio et al., 2018

Avant-propos :

Pendant des décennies, d'intenses efforts de recherche ont été consacrés à la mise au point de méthodes permettant de purifier des acides nucléiques d'origines biologiques diverses. La forte propriété des sels chaotropiques à dénaturer les protéines, la séparation différentielle des acides nucléiques et protéines en simultané (phase aqueuse vs phase organique) et le fait que les acides nucléiques se lient fortement et sélectivement aux matrices à base de silice sont des découvertes clés qui ont permis la mise en œuvre de protocoles simples d'isolation des acides nucléiques et le développement de kits commerciaux qui sont largement utilisés depuis. La fonction biologique des acides nucléiques dépend des protéines qui y sont liées et de ce fait, différents protocoles ont également été développés pour isoler les complexes ADN-protéine et ARN-protéine. L'un des points essentiels pour l'isolation de ce type de complexe est la stabilisation des interactions directes entre acides nucléiques et protéines qui les lient par les UV-C plus particulièrement, ce qui permet l'application de conditions stringentes afin d'éliminer ou de réduire la contamination par d'autres composants cellulaires. Une de ces méthodes a été décrite précédemment dans le protocole n°1 (CLIP). Dans le cadre du 2C, il est question de tirer profit de la méthode de purification des acides nucléiques par une matrice de silice pour capturer indirectement la/les protéine(s) liée(s) de manière covalente aux acides nucléiques, ici 53BP1. En fait, dans notre cas, la présence d'éthanol dans les tampons permet de ne retenir que les ARN sur la colonne. Ainsi, les principaux avantages du 2C sont l'isolement simple et rapide des complexes ARN-protéine et la non nécessité d'avoir recours à la radioactivité pour leur détection. Le protocole ci-dessous détaille les différentes étapes à suivre et conseils à appliquer pour réaliser le 2C (les grandes lignes du protocole sont résumées dans la figure en fin de protocole).

MATERIELS

➤ Réactifs

- Anticorps purifié lapin anti-53BP1 polyclonal (Bethyl Laboratories, cat. no. A300-272A)
- Anticorps souris anti-GFP monoclonal (Roche, cat. no. 1181446001)
- Cocktail inhibiteur de protéases (Roche, cat. no. 11836170001)
- DMEM high-glucose (Biowest, cat. no. L0101-500)
- Ethanol BioUltra 99,8 % (Sigma, cat. no. 51976)
- Gamme BSA pour le dosage BCA (Biorad, cat. no. 500-0207)
- Glycerol (Sigma, cat. no. G5516)
- HEPES solution 1M (Sigma, cat. no. H0887)
- IGEPAL® CA-630 (NP-40) (Sigma, cat. no. I3021)
- LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen, cat. no. NP0007)
- MEM de Eagle (Eurobio, cat. No. CM1MEM10-01)
- MgCl₂ 1M (Invitrogen, cat. no. AM9530G)
- MOPS SDS Running Buffer (20X) (Invitrogen, cat. no. NP0001)

- NaCl 5M (NaCl, Sigma-Aldrich, cat. no. S6546)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, cat. no. 23225)
- Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Biorad, cat. no. 1610374)
- Quick-RNA™ Midiprep Kit (zyzo research, cat. no. R1056)
- RNase A (Thermo Scientific, cat. no. EN0531)
- RNase I (Invitrogen, cat. no. AM2295)
- RNase OUT (Invitrogen, cat. no. 10777019)
- Sample Reducing Agent 10X (Invitrogen, cat. no. NP0004)
- Tampon de lyse (HMG150) (voir composition)
- Tampon de lyse ARN (Zymo research, cat. no. 1060-1)
- Tampon « pre-wash ARN » (Zymo research, cat. no. 1060-2)
- Tampon « wash ARN » (Zymo research, cat. no. 1060-3)
- Transfer buffer 20X (Invitrogen, cat. no. NP0006-1)
- TURBO™ DNase (invitrogen, cat. no. AM2238)

➤ **Composition des tampons**

• Tampon LDS 1X

Pour 400 µl: 100 µl LDS 4X + 40 µl Sample Reducing Agent (10X) + 260 µl H₂O

• Tampon de lyse (HMG150)

Réactifs	Concentration stock	Concentration finale	Volume à prélever
H ₂ O (QSP 40 ml)			33,72 ml
Hepes pH 7,5	1 M	20 mM	800 µl
NaCl	5 M	150 mM	1,2 ml
MgCl ₂	1 M	2 mM	80 µl
IGEPAL CA630 (NP-40)	100%	0,5%	200 µl
Glycérol	100%	10%	4 ml

• Tampon de lyse ARN (Zymo research, cat. no. 1060-1)

- 6M guanidine thiocyanate
- 4% sarcosyl
- 4% Titron X-100

• Tampon « pre-wash ARN » (Zymo research, cat. no. 1060-2)

- 4M guanidine hydrochloride
- 80% éthanol 100%

• Tampon « wash ARN » (Zymo research, cat. no. 1060-3)

- 1% Tris-EDTA pH 8
- 80% éthanol 100%

➤ **Equipements**

- Boîtes de culture cellulaire, 145*20 mm, stériles (Greiner Bio-one, cat. no. 639160)
- Concentrator « speed vac » (Eppendorf, cat. no. 5301)

- Centrifugeuse (Eppendorf, cat. no. 5425)
- ChemiDoc XRS+ Imager (Biorad)
- Grattoirs stériles (TPP, cat. no. 99002)
- Membrane de nitrocellulose 0,45 µm (VWR, cat. no. 10600002)
- Mini Trans-Blot® Cell (Biorad, cat. no. 1703930) 0,45 µm (VWR, cat. no. 10600002)
- NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10 puits (Invitrogen, cat. no. NP0321BOX)
- Quick-RNA™ Midiprep Kit (zymo research, cat. no. R1056)
- Spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific)
- Stratalinker® UV Crosslinker, Model 1800, (stratagene, cat. no. 400072)
- ThermoMixer Eppendorf (Eppendorf, cat. no. 5382000015)
- Tubes 15 ml stériles (TPP, cat. no. 91015)
- Tubes 50 ml stériles (TPP, cat. no. 91050)
- Tubes Eppendorf 1,5 ml (DNA LoBind tubes, 1,5 mL, PCR clean)
- Tubes Eppendorf 5 ml (DNA LoBind tubes, 1,5 mL, PCR clean)
- XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen cat. no. EI0001)

PROCEDURE

❖ **Culture cellulaire et traitement aux UV • DUREE 2 à 3 jours**

1. Calculer le nombre de cellules **A2058** ou **HEK293** nécessaires pour l'expérience :

- la lignée cellulaire A2058 sert au 2C « endogène ». Sans transfection de siRNA, ensemercer 3 millions de cellules par boîte de culture 14 cm pour obtenir une confluence de 80% au bout de 48h. Compter 2 boîtes pour la condition UV- et 5 boîtes pour la condition UV+. En cas de transfection pour 48h, ensemercer 2 millions de cellules la veille de la transfection.

- la lignée cellulaire HEK293 est utilisée comme modèle de surexpression des protéines de fusion-GFP. La surexpression des protéines se fait *via* une transfection de plasmide classique (forward : le lendemain de l'ensemencement) à l'aide de l'agent de transfection JetPEI. Dans ce cas, ensemercer 1,5 millions de cellules par boîte de culture 14 cm pour obtenir une confluence de 80% au bout de 72h. Compter 1 boîte pour la condition UV- et 2 boîtes pour la condition UV+.

2. Enlever le milieu des boîtes de culture, faire un lavage au PBS 1X froid (afin de retirer complètement le rouge phénol présent dans le milieu de culture, qui pourrait gêner l'action des UV-C) puis ajouter 5 ml de PBS froid **REMARQUE !** Après avoir sorti les boîtes de culture de l'incubateur, travailler sur la glace afin de prévenir l'action des RNAses qui pourraient dégrader les ARN de l'échantillon.

3. Ôter le couvercle de la boîte de culture et la placer dans le Stratalinker® sur un bac de glace. Appliquer aux cellules les UV-C (254 nm) à raison de 4000*100µJ/cm² (soit 400 mJ/cm²). Récupérer les cellules à l'aide d'un grattoir et les transférer dans un tube Falcon 50 ml (tube UV+). **REMARQUE !** Ne pas oublier de faire un contrôle négatif sans traitement UV-C (tube UV-). **INFO** A cette dose, les UV-C permettent de « figer » les liaisons ARN-protéines présentes dans les cellules au moment de l'irradiation en créant des liaisons covalentes entre les bases nucléotidiques en contact étroit avec les acides aminés des protéines.

4. Centrifuger les tubes 5 minutes à 1500 rpm à 4°C puis éliminer le surnageant. **PAUSE** A ce stade, les culots peuvent être stockés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

◆ **ETAPE CRITIQUE** Toutes les étapes du 2C nécessitent d'utiliser du matériel le plus stérile possible afin d'éviter toute dégradation involontaire des acides nucléiques présents dans l'échantillon par des RNAses exogènes.

❖ **Lyse cellulaire et traitement RNase / DNase • DUREE 3 heures**

9. Resuspendre le culot cellulaire dans le **tampon de lyse HMG150** froid supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases ajouté extemporanément et d'anti-RNase (RNase OUT). Selon la taille du culot, le volume de resuspension sera différent. Par exemple, pour 2 boîtes de culture de 14 cm et une confluence cellulaire à 80%, compter 150 µl de tampon pour resuspendre le culot. Transférer dans un tube Eppendorf 1,5 ml.

10. Mettre le lysat cellulaire à tourner sur roue à 4°C pendant 1 heure maximum.

11. Soniquer les échantillons à l'aide d'un sonicateur à bain (ici mettre de la glace en plus de l'eau) réglé de la façon suivante : « 0,5' OFF ; 1' ON ; High intensity ; 5 minutes ». **REMARQUE !** La sonication du lysat consiste en la destruction des cellules par les ultrasons, ainsi elle permet de finaliser la lyse et également de briser la chromatine agrégée dans l'échantillon.

12. Centrifuger à 12700 rpm pendant 20 minutes à 4°C, récupérer le surnageant (appelé input) dans un tube Eppendorf 1,5 ml puis procéder au dosage protéique (à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay).

13. Une fois la concentration protéique connue, procéder au traitement RNase et DNase. Un contrôle sans RNase ni DNase est également inclus. Ainsi, 3 tubes sont préparés : un tube sans traitement, un tube traité à la RNase et un tube traité à la DNase. Ne pas oublier le tube UV-. Classiquement 1 à 2 mg de protéines sont traités à raison de 150µg de RNase A ou 30U de Turbo DNase par mg de protéine. Incuber 40 minutes à 37°C à 800 rpm. **PAUSE** A ce stade, les échantillons peuvent être stockés à -80°C pour une utilisation ultérieure. **REMARQUE !** Les contrôles RNase et DNase sont importants, ils permettent de s'assurer que la protéine d'intérêt est spécifiquement liée à l'ARN.

❖ **Extraction des ARNs par la méthode du 2C • DUREE 1 heure**

REMARQUE ! Des tampons commerciaux conçus pour l'extraction des ARN ont été utilisés pour la méthode 2C. Bien que la composition exacte de ces tampons ne soit pas divulguée, ils sont basés sur les propriétés très dénaturantes d'agents chaotropiques qui sont largement utilisés pour l'extraction d'ARN. En particulier le **tampon de lyse ARN**, le tampon « **pre-wash ARN** » ainsi que le tampon « **wash ARN** ».

La suite du protocole est réalisée entièrement à température ambiante. Une température extérieure (laboratoire et centrifugeuse) trop basse risquerait de perturber la fixation des ARN sur la colonne de silice. Enfin, vérifier qu'aucun précipité ne soit présent dans les tampons.

14. Une fois l'incubation enzymatique terminée, transférer le volume de lysat traité (=input) dans un tube Eppendorf 5 ml. **REMARQUE !** Le ou les quelques µl d'input restants dans le tube « vide » servira(ont) plus tard, en western blot, afin de contrôler la quantité de protéines de départ déposée sur la colonne.

15. 1 volume de lysat est combiné à 4 volumes de **tampon de lyse ARN**. Vortexer le tube puis ajouter un volume équivalent d'éthanol 100%. Enfin vortexer puis déposer sur une colonne de silice. **INFO** Les agents chaotropiques tels que la guanidine thiocyanate et la guanidine hydrochloride permettent de dénaturer totalement les protéines, ainsi celles qui ne sont pas liées aux ARN ne seront pas retenues par la colonne de silice, dont sa propriété biochimique principale est de retenir les acides nucléiques (libres ou non) de l'échantillon. **REMARQUE !** une seringue vissée à la colonne permet de faire passer l'échantillon à travers celle-ci, l'avantage étant que n'importe quel volume peut y être chargé (jusqu'à 30 ml).

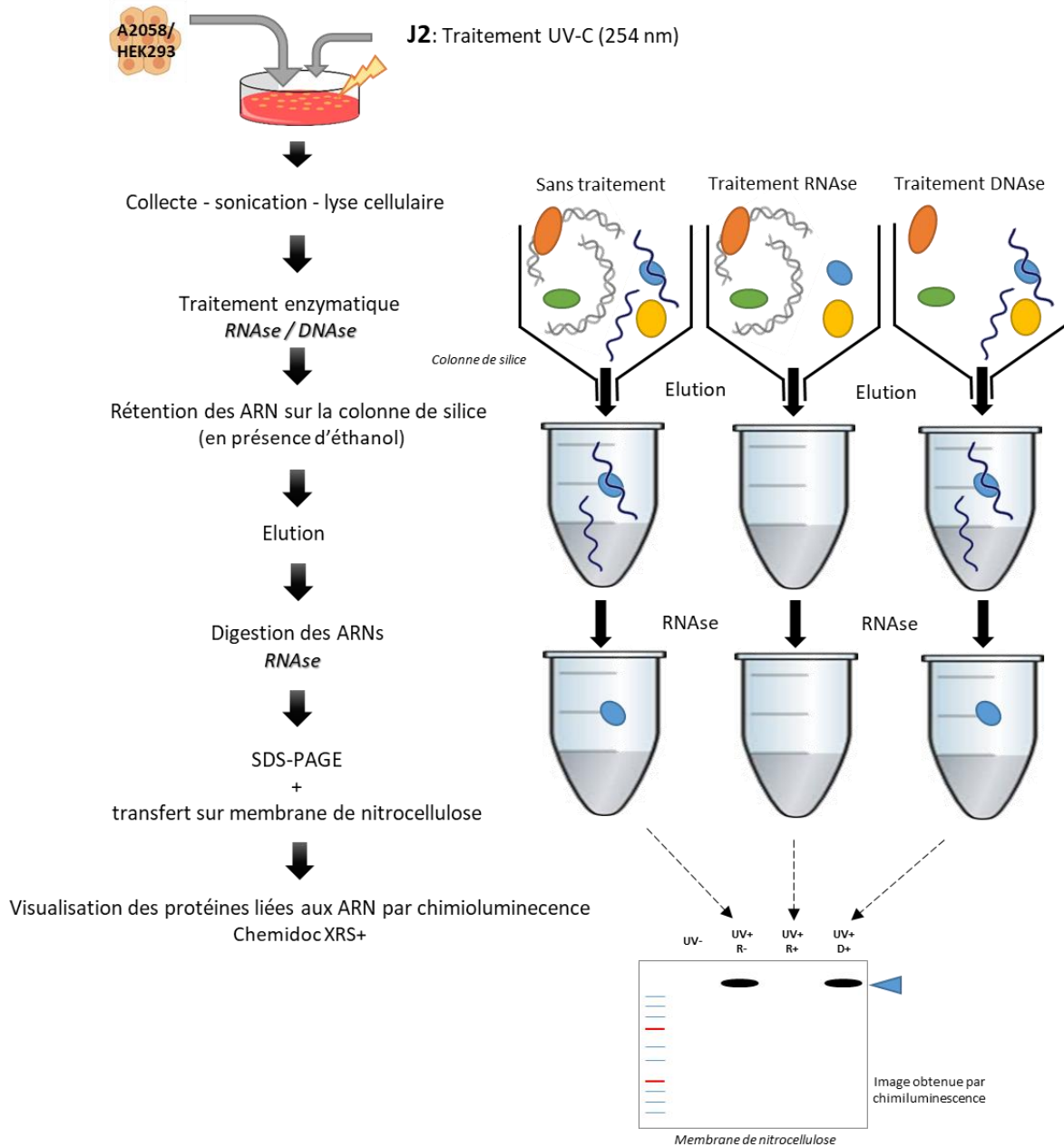
- 16.** Jeter ce qui n'est pas retenu par la colonne et la placer dans un tube collecteur. Centrifuger à 12 000 g pendant 30 secondes. Jeter le tube collecteur et placer la colonne dans un nouveau.
- 17.** Laver la colonne en y appliquant 300 µl de **tampon pré-wash ARN**. Centrifuger à 12000 g pendant 1 minute. Répéter une fois cette étape.
- 18.** Laver la colonne en y appliquant 300 µl de **tampon wash ARN**. Centrifuger à 12000 g pendant 30 secondes. Répéter une fois cette étape.
- INFO** Les tampons de lavages sont constitués à 80% d'éthanol. L'éthanol favorise la rétention de l'ARN par la colonne, plutôt que l'ADN.
- 19.** Centrifuger la colonne à 12000 g pendant 2 minutes afin d'éliminer complètement le tampon wash ARN. La colonne peut ensuite être transférée dans tube Eppendorf 1,5 ml.
- 20.** Procéder à l'élution. Pour cela, appliquer 200 µl d'H₂O préchauffée à 60°C sur la colonne et laisser incuber à 60°C pendant 10 minutes. **REMARQUE !** Les liaisons hydrogène créées entre les ARN et la matrice de silice se dissocient plus facilement sous l'effet de la chaleur. De plus l'incubation au chaud permet d'évaporer les éventuelles traces d'éthanol présentes dans la colonne.
- 21.** Centrifuger à 12000 g pendant 1 minute. **PAUSE** A ce stade, les éluats peuvent être stockés à -80°C pour une utilisation ultérieure.
- 22.** La concentration des ARN est ensuite estimée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop™

❖ **SDS-page et transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose • DUREE 5 heures**

- 23.** 50 µg d'ARN sont traités avec 500 U de RNase I pendant 40 minutes à 30°C. **INFO** Le traitement à la RNase permet ici de dégrader la totalité des ARN présents dans l'échantillon, la migration SDS-PAGE n'en sera que plus aisée (sans traitement à la RNase, les ARN peuvent « gêner » la migration des protéines).
- 24.** Réduire le volume de l'échantillon (à 10 µl) à l'aide du speed vac réglé sur 60°C. Compter environ une heure pour passer de 200 à 10 µl.
- 25.** Ajouter le LDS 4X et le reducing agent pour un volume total à déposer de 20 µl. **REMARQUE !** Les inputs sont également préparés de manière à déposer un volume total de 20 µl.
- 26.** Dénaturer les échantillons 10 min à 80°C. Charger les 20 µl d'échantillon (input et 2C) sur un gel à gradient 4-12% Bis-tris.
- 27.** Migrer à 150 V dans une cuve XCell SureLock Mini-Cell remplie de tampon MOPS 1X (fait à partir du MOPS SDS Running buffer 20X).
- 28.** Transférer les échantillons du gel sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert liquide (Mini Trans-Blot Cell) à 100 V pendant 2 heures dans le tampon de transfert 1X (celui-ci est fait à partir du tampon de Transfert 20X additionné de 20% d'éthanol absolu). **REMARQUE !** 53BP1 est une protéine de haut poids moléculaire, un transfert liquide est donc privilégié ici.
- 29.** Après le transfert, saturer la membrane au TBS- Tween 20 0,1% - 5% Lait pendant 30 minutes minimum.
- 30.** Incuber la membrane avec l'anticorps primaire anti-53BP1 dans le tampon de saturation pendant une nuit sous agitation à 4°C.
- 31.** Le lendemain, effectuer 3 lavages de 5 minutes chacun au TBS-Tween 20 0,1%.
- 32.** Incuber la membrane avec un anticorps secondaire dirigé contre l'isotype de l'anticorps primaire.
- 33.** Effectuer 3 lavages de 5 minutes chacun au TBS-Tween 20 0,1%.

34. La protéine d'intérêt est révélée par chimioluminescence, à l'aide d'un système d'acquisition d'image (Chemidoc XRS+ Imager).

J0: Ensemencement (facultatif: transfection siRNA)



Protocole du 2C (Complex Capture)

Après irradiation aux UV-C (254 nm, 400mJ/cm²), les cellules sont récoltées puis lysées. Les lysats protéiques ainsi obtenus sont traités à la RNase ou à la DNase avant d'être chargés sur colonne de silice. Les ARN des complexes ARN-protéine élués de la colonne sont ensuite dégradés et les protéines sont déposées sur gel 4-12% Bis-Tris puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Leur visualisation s'effectue par chimioluminescence.

ANNEXE N°3

SIRF (« In situ Protein Interaction with Nascent DNA Replication Forks »)

d'après Roy et al., 2018

Avant-propos :

Historiquement, l'utilisation d'analogues nucléosidiques tels que le BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) puis leur détection par immunofluorescence (IF) a permis de visualiser des protéines situées directement, ou à proximité, de l'ADN naissant (au niveau des fourches de réplication). Cette méthode fournit des informations fiables sur le processus de réplication mais c'est une méthode indirecte qui ne permet pas distinguer de manière sûre les interactions ADN-protéines des protéines localisées près des ADN naissants. Une autre méthode appelée IPOND (pour « *Isolation of Proteins on Nascent DNA* ») permet, elle, de détecter et d'isoler les protéines présentes directement sur l'ADN nouvellement synthétisé. Ici, c'est l'EdU, un analogue de la thymidine qui est utilisé. L'EdU est biotinylé à l'aide de la chimie de click puis l'ADN biotinylé est immunoprécipité. Les complexes protéines-ADN immunoprécipités vont être détectés par western-blot ou spectrométrie de masse. Bien que cette méthode révolutionnaire permette d'étudier directement les interactions entre protéines et fourches de réplication, elle détecte uniquement la valeur moyenne de milliers de fourches présentes dans des milliers de cellules en cours de réplication. L'IPOND n'est pas résolutif au niveau d'une cellule unique comme c'est le cas d'une approche par IF, qui fournit également des informations qualitatives supplémentaires telles que le stade de la phase S par exemple. De plus, la technique IPOND demande beaucoup de temps ainsi que de grandes quantités de matériel de départ (~100,000,000 cellules par condition). La technique décrite ci-dessous appelée SIRF associe la chimie de click EdU-biotine au PLA (« *proximity ligation assay* ») pour surmonter les limites citées précédemment. En bref, cette technique permet de visualiser la proximité (<40 nm) de deux protéines situées à l'ADN naissant par fluorescence grâce à la technologie Duolink® PLA. Ici, c'est la proximité entre la biotine et 53BP1 que l'on souhaite visualiser et étudier.

Le matériel nécessaire au SIRF, le protocole étape par étape, la durée, les problèmes éventuels rencontrés ainsi que leur solution vont être détaillés ci-dessous. Un schéma récapitulatif en fin de protocole (Figure 2) permet d'avoir une vue d'ensemble de ce qu'est la technique du SIRF et ses nombreux avantages. Dans notre cas, il était question de déterminer si 53BP1 est associée à l'ADN nouvelle synthétisé.

MATERIELS

➤ **Réactifs**

- 5'-ethylene-2'-deoxyuridine (EdU) (Invitrogen, cat. no. A10044)
- (+) Sodium L-ascorbate (Sigma-Aldrich, cat. No. A4034)
- Alexa Fluor 488 azide (Invitrogen, cat. no. A10266)
- Anticorps souris anti-53BP1 clone BP13 (Merck Millipore, cat. no. MAB3802)
- Anticorps souris anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, cat. no. SC-56)
- Anticorps lapin anti-biotine (Bethyl Laboratoire, cat. no. A150-109A)
- Biotin azide (Invitrogen, cat. no. B10184)
- Cocktail inhibiteur de protéases (Roche, cat. no. 11836170001)

- Copper(II) sulfate, anhydrous, 98% (Alfa Aesar, cat. no. A13986) ! **ATTENTION** Toxique en cas d'ingestion et provoque une irritation de la peau et des yeux.
- NaCl 5M (NaCl, Sigma-Aldrich, cat. no. S6546)
- DMEM high-glucose (Biowest, cat. no. L0101-500)
- Duolink® In Situ Detection Reagents FarRed (Sigma-Aldrich, cat. no. DUO92013)
- Duolink® Mouse plus PLA probe (Sigma-Aldrich, cat. no. DUO92001-100RXN)
- Duolink® Rabbit minus PLA probe (Sigma-Aldrich, cat. no. DUO92005-100RXN)
- DMSO (Sigma-Aldrich, cat. no. D8418)
- H₂O distillée ultrapure DNase/RNase free (Invitrogen, cat. no. 10977-035)
- MgCl₂ 1M (Invitrogen, cat. no. AM9530G)
- Normal Goat Serum (10%) (ThermoFisher Scientific, cat. no. 50197Z)
- OptiMEM (Gibco, cat. no. 11058021)
- Paraformaldehyde 16% (Alfa Aesar, cat. no. 43368) ! **ATTENTION** Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation. A conserver dans une armoire à produits chimiques.
- PBS 1X (laverie)
- PIPES (Sigma-Aldrich, cat. no. P1851)
- ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, cat. no. P36935)
- Solution de Click (voir composition)
- Solution de fixation (voir composition)
- Sucrose (Sigma-Aldrich, cat. no. S0389)
- Tampon A (voir composition)
- Tampon B (voir composition)
- Tampon d'extraction/perméabilisation CSK-T (voir composition)
- Tampon de pré-extraction CSK (voir composition)
- Tampon de blocage (voir composition)
- Thymidine (Sigma-Aldrich, cat. no. T1895)
- Tris-HCl 1M pH 7,5 (Invitrogen, cat. no. 15567027)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, cat. no. T9284) ! **ATTENTION** Dangereux en cas de contact avec les yeux, d'ingestion ou d'inhalation.
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, cat. no. P7949)

➤ **Préparation des réactifs et composition des tampons**

- **Edu** Dissoudre dans le DMSO pour obtenir une concentration finale de 10 mM. Protéger de la lumière. Stocker en aliquots à -20°C pendant un an maximum. Décongeler à 37°C avant utilisation. Pour le marquage cellulaire EdU, diluer directement dans le milieu de culture pour une concentration finale à 25 µM.
- **Thymidine** Dissoudre dans l'H₂O pour obtenir une concentration finale de 10 µM. Stocker en aliquots à -20°C pendant un an maximum. Décongeler la solution avant son utilisation. Diluer directement dans le milieu de culture pour avoir une concentration finale à 100 µM.

• **Tampon de pré-extraction CSK et d'extraction/perméabilisation CSK-T :**

Réactifs	Concentration stock	Concentration finale	Volume à prélever CSK (50 ml)	Volume à prélever CSK-T (50 ml)
H ₂ O			36,35 ml	33,85 ml
PIPES pH 6,8	100 mM	10 mM	5 ml	5 ml
NaCl	5 M	100 mM	1 ml	1 ml
Sucrose	2 M	300 mM	7,5 ml	7,5 ml
MgCl ₂	1 M	3 mM	150 µl	150 µl
Inhibiteurs de protéases			1 pastille	1 pastille
Triton X-100	10%	0,5%		2,5 ml

• **Paraformaldehyde 4%** Diluer le PFA 16% 1:4 dans du PBS. Préparer fraîchement ce réactif et le maintenir à température ambiante jusqu'à la fixation cellulaire ! **ATTENTION** A reconstituer sous une hotte chimique à filtration.

• **CuSO₄ (100 mM)** Préparer un stock 1M de CuSO₄ dans l'H₂O, stocker à RT pour plusieurs mois, à l'abri de la lumière.

• **Biotin-azide (5 µM)** Dissoudre dans du DMSO pour obtenir une concentration finale à 5 µM.

• **Sodium ascorbate (1M)** Préparer fraîchement une solution à 1M dans du PBS 1X. Limiter l'exposition à l'air et stocker dans la glace jusqu'à son utilisation.

• **Solution de Click**

Réactifs	Concentration stock	Concentration finale	Volume à prélever
PBS 1X (QSP 1mL)			895,6 µl
Biotin-Azide	5 mM	9,5 µM	1,9 µl
Sodium ascorbate	1 M	100 µM	100 µl
CuSO ₄	1 M	2 mM	2 µl
Alexa Fluor 488 Azide	1 mM	0,5 µM	0,5 µl

• **Solution de blocage** Ajouter du Triton X-100 au normal goat serum 10% pour avoir une concentration finale en Triton X-100 à 0,1%.

• **Tampon A, pH 7,4**

Réactifs	Concentration stock	Concentration finale	Volume à prélever
H ₂ O (QSP 1 L)			959,5 ml
Tris-HCl	1 M	10 mM	10 ml
NaCl	5 M	150 mM	30 ml
Tween 20	100%	0,05%	500 µl

• **Tampon B**

Réactifs	Concentration stock	Concentration finale	Volume à prélever
H ₂ O (QSP 1 L)			780 ml
Tris-HCl	1 M	200 mM	200 ml
NaCl	5 M	100 mM	20 ml

➤ **Equipements**

- Chambre humide (boite hermétique contenant un papier absorbant imbibé d'eau)
- Incubateur maintenant une atmosphère humide, 37°C et 5% de CO₂
- Jarre de Coplin
- Microscope à fluorescence
- Millicell EZ SLIDE 8-well glass, stériles (Merk Millipore, cat. no. PEZGS0816)
- Lamelles couvre-objets 24*50 épaisseur No. 1,5 (VWR, cat. no. 631-0147)

- Pompe d'aspiration de paillasse VACUSIP (Integra, cat. no. 159 010)
- Tubes Eppendorf 1,5 ml

➤ **Logiciels**

GraphPad Prism (GraphPad, <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>)

ImageJ (ImageJ, <https://imagej.net/Welcome>)

PROCEDURE

❖ **Culture cellulaire • DUREE 2 à 3 jours**

1. Calculer le nombre de cellules **U2OS** nécessaires pour l'expérience. Compter 30000 cellules par puits, 48 heures avant l'incorporation de l'EdU (Etape 3). Le nombre de cellules peut devoir être ajusté en fonction de l'application et du type cellulaire.

2. Les cellules sont ensemencées directement sur lame Millicell EZ slide (500 µl de milieu DMEM par puits). Surveiller la température de l'incubateur (37°C) et le contenu en CO₂ (5%). L'incorporation d'EdU n'est optimale que si ces paramètres sont respectés. Si une chasse thymidine est effectuée, équilibrer le milieu à 37°C et 5% de CO₂ pendant une nuit.

◆ **ETAPE CRITIQUE** Il est préférable de se situer à une confluence maximale de 70% au moment de l'incorporation d'EdU (étape 3) pour travailler avec des cellules en phase de croissance optimale. Ceci est également vrai pour le PLA effectué par la suite. En effet, une confluence trop élevée empêchera la pénétration correcte des réactifs et diminuera le signal spécifique.

2 bis. Si les cellules sont transfectées par un siRNA, la transfection est effectuée pendant 48h le lendemain de la mise en culture des cellules. Ici, il sera nécessaire de planter 20000 cellules.

❖ **Marquage de l'ADN naissant avec l'EdU • DUREE 8 min – 4h**

3. Pour faire le marquage Edu, sortir la lame de l'incubateur et la placer sous un PSM. **INFO** L'EdU est un analogue de la thymidine ayant la particularité de posséder un groupement alkyne, capable, en présence de cuivre de se lier de manière covalente à un groupement azide présent sur une autre molécule telle qu'un marqueur fluorescent par exemple. Ainsi, l'ADN marqué sera détecté par imagerie.

4. Ajouter 1,25 µl de la solution stock d'EdU 10 mM dans les 500 µl de milieu contenu dans chaque puits pour atteindre une concentration finale de 25 µM. Homogénéiser par pipetage en faisant des vas et viens. Replacer la lame dans l'incubateur pendant le temps désiré (ici 8 minutes).

5. Si aucune chasse à la thymidine ou traitement ne sont effectués, passer directement à l'étape 7.

6. Pour effectuer la chasse à la thymidine, sortir les cellules de l'incubateur et retirer le milieu des puits. Laver les puits deux fois avec 100 µl de PBS. Mettre 500 µl de milieu contenant la thymidine dans les puits concernés par la chasse. Replacer la lame dans l'incubateur pendant le temps désiré (ici 4heures).

◆ **ETAPE CRITIQUE** Il est important d'effectuer les étapes 3 à 6 le plus rapidement possible afin de prévenir les changements de pH et température du milieu, qui peuvent affecter l'efficacité de la réplication.

❖ **Lavages, perméabilisation et fixation des cellules • DUREE 40 min**

7. Après le marquage de l'ADN à l'EdU, retirer le milieu des puits et immédiatement laver les puits deux fois au PBS 1X froid.

8. Faire un lavage au **tampon CSK** froid puis incuber les cellules dans le **tampon CSK-T** froid pendant 5 minutes à 4°C. Faire de nouveau un lavage au tampon CSK froid. **REMARQUE !** L'extraction est une technique largement utilisée en immunomarquage pour libérer les protéines solubles avant le marquage immunofluorescent. Le détergent Triton X-100 contenu dans le tampon CSK-T perméabilise la membrane cytoplasmique et permet aux anticorps d'accéder plus facilement aux structures intracellulaires.

9. Laver de nouveau une fois les puits au PBS 1X

◆ **ETAPE CRITIQUE** Les tampons utilisés dans les étapes 7 à 9 doivent être froids afin de ralentir au maximum les réactions se produisant dans les cellules et empêcher la réplication, par exemple, de continuer avant la fixation des cellules (étape 10).

10. Une fois perméabilisées, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 20 minutes à température ambiante. Pour cela, mettre (sous une hotte chimique) environ 100 µl de PFA 4% par puits. **INFO** La PFA induit des liaisons covalentes entre les molécules empêchant les structures intracellulaires de se désagréger et de se disperser après la perméabilisation. **REMARQUE !** La durée de la fixation est optimisée pour les cellules U2OS mais elle peut être différente en fonction des lignées.

❖ Réaction de Click et blocage • DUREE 2h

11. Après la fixation, la PFA est retirée (récupérée et traitée en déchet CMR) et les puits sont lavés au PBS 1X. Les puits sont détachés de la lame et elle est ensuite lavée au PBS 1X deux fois pendant 5 minutes sous faible agitation.

REMARQUE ! A partir de cette étape : (i) les lavages se font dans des jarres de Coplin (50 ml). (ii) avant de déposer le volume réactionnel, le liquide excédentaire présent dans les puits est aspiré à l'aide de la pompe d'aspiration (pencher légèrement la lame afin que le liquide s'écoule au bord du puits), (iii) les réactions se font dans une chambre humide (boîte hermétique opaque dans laquelle un papier absorbant est imbibé d'eau) pour éviter toute évaporation des solutions réactionnelles.

◆ **ETAPE CRITIQUE** Il est important de laver la lame dans un grand volume de PBS pour ne pas affecter les traitements qui seront effectués par la suite.

12. Chaque puits individualisé de la lame est incubé à température ambiante pendant 1 heure avec 25 µl de **solution de Click** fraîchement préparée selon le tableau 2 et en respectant l'ordre indiqué pour l'ajout des réactifs.

◆ **ETAPE CRITIQUE** Une solution d'ascorbate de sodium 1M est fraîchement constituée à chaque préparation de la solution de Click car il est instable en solution.

13. La lame est lavée une fois au PBS 1X pendant 5 minutes sous faible agitation.

14. Incuber la lame avec la **solution de blocage** pendant 1h minimum

❖ Incubation avec les anticorps primaires • DUREE 1 nuit

15. Diluer les anticorps primaires d'intérêts dans le tampon de blocage. Respecter les dilutions ci-dessous :

Anticorps	Espèce hôte	Dilution optimale
Anti-biotine	Lapin	1/4000 ^{ème}
Anti-53BP1	Souris	1/1000 ^{ème}
Anti-PCNA	Souris	1/500 ^{ème}

REMARQUE ! La dilution des anticorps est fonction de la lignée cellulaire utilisée d'où l'importance de sa mise au point pour des résultats optimaux. En pratique, tester 2 ou 3 concentrations d'anticorps et ne retenir que celle qui semble générer le moins de bruit de fond, tout en restant spécifique de la protéine ciblée.

16. Chaque puits de la lame est incubé pendant une nuit à 4°C avec 25 µl de solution d'anticorps primaires **INFO** Les deux anticorps primaires utilisés pour détecter deux protéines différentes doivent provenir de deux espèces différentes, par exemple, l'anti-53BP1 de souris et l'anti-biotine de lapin (Figure 1A).

❖ PLA (proximity ligation assay) • DUREE 4h15

17. Après l'incubation d'une nuit, laver trois fois la lame au **tampon A** pendant 5 minutes **REMARQUE !** La jarre de Coplin contenant la lame est mise à agiter afin d'enlever au mieux les anticorps qui se seraient fixés de manière aspécifique

◆ **ETAPE CRITIQUE** Pour la partie PLA, respecter le nombre et le temps des lavages pour éviter un niveau élevé de signal non spécifique. Utiliser également des tampons de lavages récents, à température ambiante.

18. Préparer la solution contenant les sondes PLUS et MOINS spécifiques des anticorps primaires en les diluant au 1/5^{ème} dans la solution de blocage. Par exemple, préparer un anti-souris-PLUS et un anti-lapin-MOINS lorsqu'un anti-53BP1 de souris et un anti-biotine de lapin sont utilisés.

19. Enlever l'excédent de tampon A puis ajouter 25 µl de solution de sondes par puits. Incuber pendant une heure à 37°C.

INFO Chaque paire d'anticorps secondaires (appelées sondes PLA) est conjuguée à un oligonucléotide à brin unique court (on a ainsi une paire assortie d'oligonucléotides marquée PLUS+ et MOINS-) Cette paire va se lier aux anticorps primaires spécifiques des deux protéines d'intérêt (Figure 1B).

20. Laver trois fois la lame au **tampon A** pendant 5 minutes sous faible agitation.

21. Préparer la solution de ligation en diluant le tampon de la ligase au 1/5^{ème} et la ligase au 1/40^{ème} dans de l'H₂O autoclavée. **REMARQUE !** Vortexer le tampon de la ligase pendant et après sa décongélation afin de dissoudre les précipités. Garder la ligase dans un bloc froid à -20°C lorsqu'elle est sortie du congélateur.

INFO Si les deux protéines ciblées sont en étroite proximité (distance inférieure ou égale à 40 nm), les sondes vont s'hybrider et être ligaturées via deux nucléotides connecteurs additionnels ce qui formera une structure d'ADN circulaire (Figure 1C et D).

22. Enlever l'excédent de tampon A puis ajouter 25 µl de solution de ligation par puits. Incuber pendant 30 min à 37°C.

23. Laver trois fois la lame au **tampon A** pendant 5 minutes sous faible agitation.

24. Préparer la solution d'amplification en diluant le tampon de la polymérase au 1/5^{ème} et la polymérase au 1/80^{ème} dans de l'H₂O autoclavée. **REMARQUE !** Limiter l'exposition à la lumière de la solution stock d'amplification. Garder la polymérase dans un bloc froid à -20°C lorsqu'elle est sortie du congélateur.

25. Enlever l'excédent de tampon A puis ajouter 25 µl de solution d'amplification par puits. Incuber pendant 100 minutes maximum à 37°C.

INFO L'ADN circulaire généré à l'étape précédente va être amplifié environ 1000 fois par l'ADN polymérase par le simple mécanisme d'amplification par cercle roulant. Puis des oligonucléotides complémentaires fluorescents vont hybrider à des séquences répétitives dans les amplicons permettant la visualisation du signal par microscopie (reflétant la proximité des deux protéines) (Figure 1E et F).

26. Laver deux fois la lame au **tampon B** pendant 10 minutes en limitant son exposition à la lumière.

27. Laver une minute la lame au tampon B dilué 100 fois dans de l'H₂O autoclavée.

❖ Coloration au DAPI et montage de la lame • DUREE 10 minutes

28. Enlever l'excédent de tampon B dilué et ajouter une goutte de ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI sur chaque puits en évitant la création de bulles d'air.

29. Placer une lamelle sur la lame sans trop appuyer afin d'éviter de créer des bulles d'air à l'intérieur de puits.

30. Sceller la lame en appliquant quelques gouttes de vernis à ongle aux extrémités de la lamelle puis laisser sécher à l'air libre dans un endroit sombre.

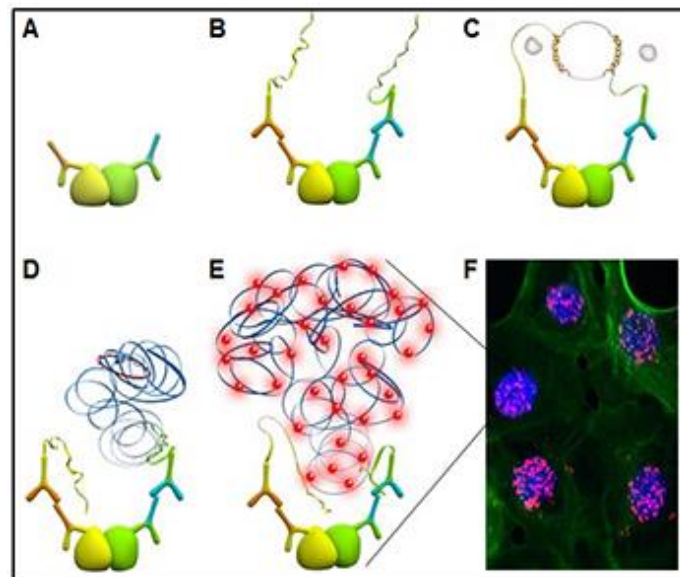


Figure 1 : Schéma représentatif d'une réaction de PLA (Duolink®)

ANALYSES DES DONNEES

- Les images sont obtenues à l'aide du microscope à fluorescence Leica à déconvolution 3D au grossissement 63x (ouverture numérique 1,4). Les signaux PLA sont capturés à l'aide du canal CY5 (longueur d'onde d'excitation : 644 nm, longueur d'onde d'émission : 669 nm, selon les recommandations de Sigma Duolink, pour le réactif de détection Duolink FarRed). Le canal FITC est utilisé pour imager les cellules en cours de réplication (phase S) marquées par l'Alexa 488-azide (excitation : 495 nm, émission : 519 nm). Le canal DAPI est utilisé pour visualiser les noyaux (excitation : 398 nm, émission : 461 nm). Généralement, environ 10 champs d'images sont capturés dans différentes zones du puits, pour un total d'environ 100 cellules par condition.
- Le nombre de signaux PLA par noyaux EdU positifs est déterminé grâce au logiciel ImageJ, à l'aide d'une macro automatique.
- Si les données suivent une distribution non normale mesurée par le test de normalité D'Agostino & Pearson, un test t de Mann-Whitney est utilisé pour déterminer la significativité statistique des différences de signaux SIRF entre les conditions (Roy et al., 2018).

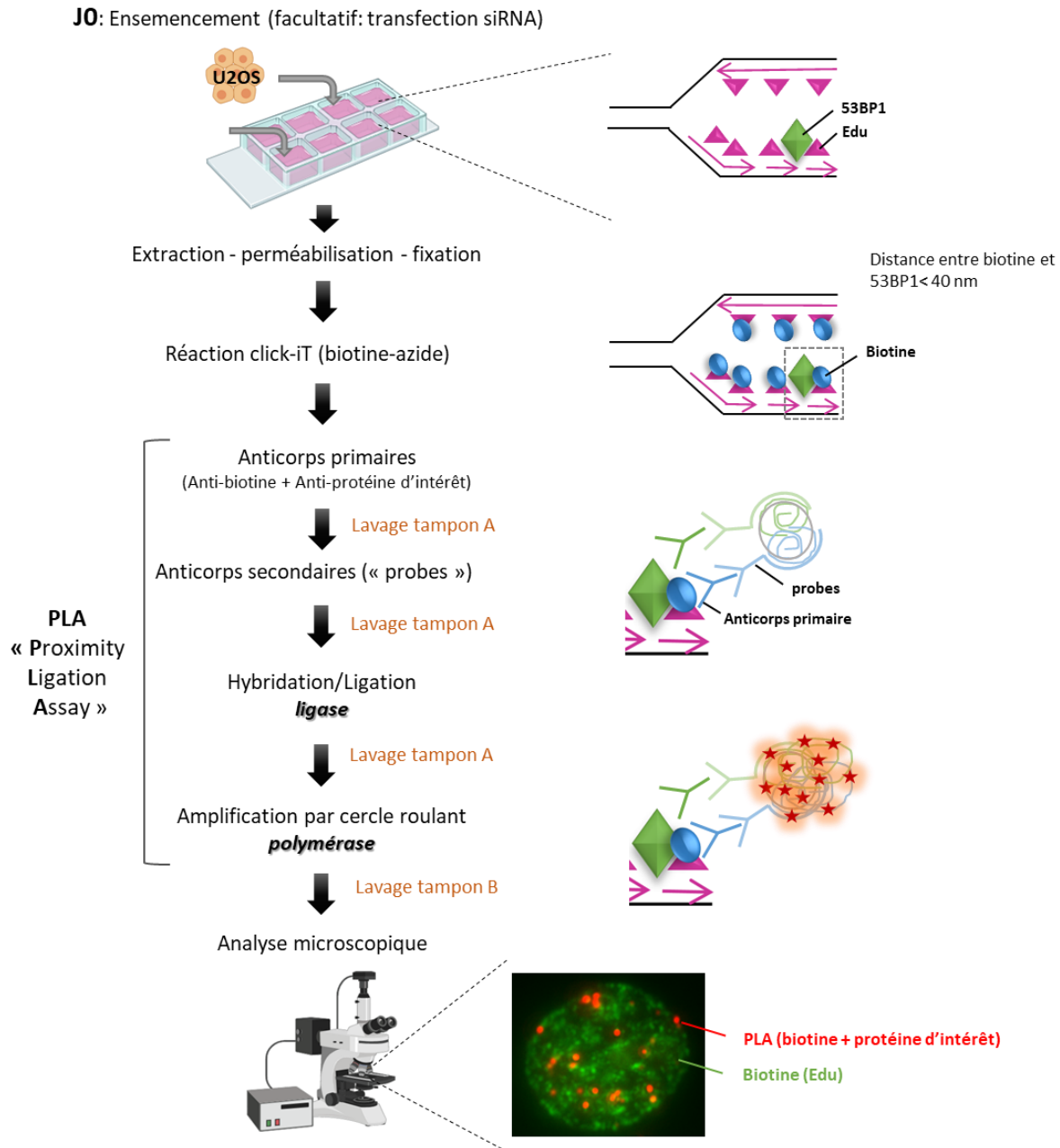


Figure 2: Protocole simplifié du SIRF

L'EdU est incorporé à l'ADN nouvellement synthétisé de cellules en prolifération, qui sont ensuite perméabilisées puis fixées. La réaction de click-iT va permettre de fixer la biotine à l'EdU. La biotine et la protéine d'intérêt (53BP1) vont être reconnues par deux anticorps primaires distincts issus de deux espèces différentes. Ces anticorps vont être reconnus spécifiquement par des probes, anticorps secondaires couplées à des amorces d'ADN. Si les deux protéines sont très proches (<40 nm), les amorces d'ADN vont s'hybrider, être ligaturées par une ligase puis amplifiées par cercle roulant par une polymérase. L'ajout d'oligonucléotides fluorescents qui vont s'hybrider à l'ADN amplifié va permettre la visualisation du signal par microscopie.

Titre : Mise en évidence d'une interaction entre la protéine 53BP1 et les fragments d'Okazaki.

Mots clés : Protéines de liaison aux ARN ; Réplication de l'ADN ; Fragments d'Okazaki ; 53BP1

Résumé : Le maintien de l'intégrité du génome est un processus crucial à la vie cellulaire. Ce n'est que récemment que les protéines de liaison à l'ARN (« RNA-binding protein » ou RBP) ont été montrées être impliquées dans ce processus. En présence d'ADN endommagé, les RBP régulent l'expression des gènes de réponse aux dommages de l'ADN et contrôlent le destin cellulaire. Elles jouent également un rôle plus direct dans la prévention et la réparation des dommages de l'ADN. De plus, des ARN sont présents aux sites de dommages de l'ADN et participent au maintien de l'intégrité du génome. Ainsi, le laboratoire recherche des acteurs protéiques capables de lier directement l'ARN au sein des protéines médiatrices de la réponse aux dommages de l'ADN. Un des candidats est la protéine 53BP1 (p53 binding protein 1) qui contient un domaine de liaison à l'ARN nommé domaine GAR (« Glycine-Arginine Rich »). 53BP1 est un acteur central de la signalisation des cassures double-brin de l'ADN et de la régulation de leur réparation par le processus de jonction d'extrémités non homologues pendant la phase G1 du cycle cellulaire. Le recrutement de 53BP1 aux sites de dommages de l'ADN dépend à la fois d'interactions directes entre 53BP1 et des marques d'histones, mais aussi d'une composante ARN.

L'objectif était d'étudier l'interaction entre 53BP1 et l'ARN.

Grâce aux méthodes de CLIP (« CrossLinking and ImmunoPrecipitation ») et de 2C (« Complex Capture »), nous avons montré que 53BP1 possède une activité de liaison directe à l'ARN, *via* son domaine GAR.

Nous avons identifié l'acide nucléique interagissant avec 53BP1 comme étant une chimère ARN-ADN constituée d'une partie d'environ 10 ribonucléotides, suivie d'environ 100 désoxyribonucléotides. Ce type de molécule est très similaire à celle des fragments d'Okazaki qui sont impliqués dans l'initiation de la synthèse du brin retardé de la fourche de réplication. Par la méthode de SIRF (« In Situ Protein Interaction with Nascent DNA Replication Forks »), nous avons montré que 53BP1 est présente au niveau de l'ADN naissant, dans un contexte de réplication normale. De plus, la déplétion de la sous-unité catalytique de la primase (PRIM1), qui synthétise l'amorce ARN des fragments d'Okazaki, conduit à la diminution de la présence de 53BP1 à proximité d'ADN naissant. La déplétion de PRIM1 affecte également l'interaction de 53BP1 avec la chimère ARN-ADN *in vivo*. Ces résultats indiquent que 53BP1 est présente à la fourche de réplication *via* une interaction directe avec les fragments d'Okazaki. Enfin, sous stress réplcatif induit par l'hydroxyurée, la présence de 53BP1 au niveau de l'ADN naissant est fortement augmentée, indiquant que 53BP1 s'accumule aux fourches de réplication bloquées. L'ensemble de ces résultats montre que 53BP1 est une protéine de liaison aux ARN qui interagit directement avec les fragments d'Okazaki.

Title : 53BP1 is an RNA binding protein that directly interacts with Okazaki fragments

Keywords : RNA-binding proteins ; DNA replication ; Okazaki fragments ; 53BP1

Abstract : Maintenance of genome integrity is essential for cell survival. It is only recently that RNA-binding proteins (RBPs) have been shown as fundamental actors in this process. In the presence of DNA damage, RBPs regulate the expression of DNA damage response (DDR) related genes and control cell fate. RBPs also have a more direct role in preventing and repairing DNA damage. Moreover, some RNAs are present at sites of DNA damage and, thus, participate in the maintenance of genome integrity. The laboratory is interested in proteins that are both able to directly bind RNA and involved in DDR. One candidate is the 53BP1 protein (p53 binding protein 1) that contains an RNA-binding domain called GAR domain (Glycin-Arginin Rich). 53BP1 is a key protein mediating the signalling of DNA double-strand breaks and channels DNA repair to the non-homologous end-joining pathway during the G1 phase of the cell cycle. The recruitment of 53BP1 to sites of DNA damage depends on both histones marks and an RNA component.

The objective was to study the interaction between 53BP1 and RNA. By using CLIP (CrossLinking and Immunoprecipitation) and 2C (Complex Capture) technologies, we showed that 53BP1 presents a direct RNA-binding activity within its GAR domain.

We identified the nucleic acid interacting with 53BP1 as being an RNA-DNA chimera composed of about 10 ribonucleotides, followed by about 100 dexoribonucleotides. This type of entity is highly similar to that of Okazaki fragments, that are involved in the initiation of lagging strand synthesis at replication forks. By using the SIRF method (In Situ Protein Interaction with Nascent DNA Replication Forks), we showed that 53BP1 is localized at sites of newly synthesized DNA, under normal conditions of replication. Furthermore, depletion of the catalytic sub-unit of the primase (PRIM1), that catalyzes the synthesis of the RNA primer of Okazaki fragments, results in a decrease in 53BP1 at sites of newly synthesized DNA. PRIM1 depletion also decreases the interaction between 53BP1 and RNA-DNA chimera *in vivo*. These results indicate that 53BP1 is localized at the replication fork through a direct interaction with Okazaki fragments. Likewise, under replicative stress induced by hydroxyurea, the presence of 53BP1 at the newly synthesized DNA is increased, indicating that 53BP1 accumulates at stalled replication forks. Altogether, these results show that 53BP1 is an RNA-binding protein that directly interacts with Okazaki fragments.