

École doctorale des sciences de la vie et de la santé
IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire)
CNRS UMR 7104 - Inserm U 964

THÈSE présentée par :
Salim ZIANI

Soutenue le : **23 juin 2014**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Etude du complexe de réparation par
excision de nucléotides**

THÈSE dirigée par :
Dr. COIN Frédéric

DR, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. DUBRANA Karine

DR, CEA Fontenay-aux-roses, France

Dr. PROIETTI-DE-SANTIS Luca

DR, university of Tuscia, Italie

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. CERALINE Jocelyn

DR, université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens à remercier Dr. Karine Dubrana, Dr. Luca Proietti-De-Santis et Dr. Jocelyn Ceraline d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie vivement Dr. Frédéric Coin de m'avoir donné la chance de travailler au sein de son équipe, et de m'avoir guidé tout au long de mon doctorat, ce fut un réel plaisir que de travailler avec lui.

Je remercie particulièrement Mme. Annabel Larnicol pour son aide technique très précieuse, mais aussi pour sa bonne humeur permanente.

Merci à Zita Nagy avec qui j'ai collaboré durant la deuxième partie de mon projet, pour son travail méthodique et minutieux. Merci à Sergey qui a également participé à ce projet.

Je remercie également Dr. Jean-Marc Egly, et tous les membres de l'équipe : Nicolas, Manu, Cathy pour sa gentillesse et sa disponibilité légendaires, Philippe, ainsi que les post-doc et étudiants : Marc, Carlos, Alexey, Amita, Lise Marie, Marissa, Federico et Baptiste, je vous souhaite à tous bonne chance pour la suite.

Merci à Charlotte d'avoir partagé avec moi toutes ces agréables et désormais rituelles pauses café qui nous permettent de nous échapper du labo pendant quelques minutes et de respirer de l'air frais (et quelques bouffées de nicotine).

Je tiens aussi à remercier l'association ARC (association pour la recherche contre le cancer) pour avoir financé ma troisième année de thèse.

Je dédie ce travail à mes parents qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager, malgré mes études qui n'en finissent pas, à mes petites sœurs, à mon frère son épouse et leur petite fille.

Merci à Alex, pour tout.

Merci aussi à tous mes amis de France et d'Algérie.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES ABREVIATIONS	5
RESUME DE LA THESE	7
INTRODUCTION	12
I. DOMMAGES SUBIS PAR L'ADN	16
II. LES SYSTEMES DE REPARATION	18
II.1. REPARATION PAR REVERSION DIRECTE	18
II.2. REPARATION PAR EXCISION DE BASES BER	18
II.3. REPARATION DES MESAPPARIEMENTS MMR	20
II.4. REPARATION DES CASSURES DOUBLE BRIN	21
II.5. REPARATION PAR EXCISION DE NUCLEOTIDES NER	23
II.6. PATHOLOGIES LIEES AU SYSTEME NER	27
II.7. SOUS-UNITE TTDA DE TFIH	29
PARTIE I : SOUS-UNITE TTDA DE TFIH.	31
MATERIEL ET METHODES	33
RESULTATS	37
1. ZBTB38 INTERAGIT AVEC TTDA	37
2. ZBTB38 EST NECESSAIRE A L'ACTIVITE NER	38
3. ZBTB38 EST RECRUTEE SUR LES SITES DE REPARATION NER DEPENDAMMENT DE TTDA	40
DISCUSSION ET PERSPECTIVES:	43
1. L'APPORT DU CRIBLE DOUBLE HYBRIDE	43
2. ZBTB38 ET TTDA	44
PARTIE II : ETUDE DU RECRUTEMENT DES FACTEURS NER SUR LA CHROMATINE EN ABSENCE DE DOMMAGES DE L'ADN.	46
RESULTATS	47
PUBLICATION : MOLECULAR INSIGHTS INTO THE FORMATION OF THE NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR COMPLEX REVEALED ON UNDAMAGED CHROMATIN.	47
DISCUSSION	76
1. L'IMMOBILISATION DE FACTEURS NER PERMET LA FORMATION SEQUENTIELLE DU P _{INC}	76
2. TTDA JOUE UN ROLE CLE DANS L'ASSEMBLAGE DU P _{INC}	78
3. DOMAINES D'INTERACTION DE XPC AVEC HHR23B ET TFIH	80
REFERENCES	82

Liste des Figures

<i>Figure 1 : Principales lésions de l'ADN.</i>	17
<i>Figure 2 : Différents systèmes de réparation prenant en charge différents types de dommages.</i>	18
<i>Figure 3 : Mécanisme de la réparation par excision de base (BER).</i>	19
<i>Figure 4 : Mécanisme de la réparation MMR.</i>	20
<i>Figure 5 : Mécanismes de réparation des cassures double-brin.</i>	22
<i>Figure 7 : Mutations identifiées chez les patients TTD-A.</i>	30
<i>Figure 8 : Représentation de la structure de TTDA.</i>	30
<i>Figure 9 : ZBTB38 interagit avec TTDA par son domaine Kaiso-like ZF.</i>	38
<i>Figure 10 : Criblage siRNA/NER.</i>	39
<i>Figure 11 : la sous-expression de ZBTB38 perturbe l'activité NER.</i>	40
<i>Figure 12 : ZBTB38 est recrutée sur les sites de réparation NER.</i>	41
<i>Figure 13 : le recrutement de ZBTB38 sur les sites NER dépend de TTDA.</i>	42

Liste des abréviations

6-4PP	6,4 pyrimidine-pyrimidones
AA	Acide aminé
Ac	Anticorps
ADNpol	ADN polymerase
AP	site apurique/apyrimidique
ARNPII	ARN polymérase II
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BER	Base excision repair
BTB/POZ	BR-C, ttk and bab / Pox virus and Zinc finger
CAK	cyclin-activated kinase
CFS	Common fragile sites
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CPD	cyclobutane pyrimidine dimer
CS	Cockaye syndrome
DBD	DNA binding domain
DDB2	DNA damage binding protein 2
DDR	DNA damage response
DSB	Double strand break
FCS	Fetal calf serum
GFP	Green fluorescent protein
GG-NER	Global genome NER
GWA	Genome-wide association study
IF	Immunfluorescence
IP	immunoprécipitation
KO	Knock out
LacO	Lactose operator
LacR	Lactose repressor
MBD	Methyl-DNA Binding Domain
MBP	Methyl-DNA Binding Protein
MGMT	O6-methylguanine methyltransferase
MMR	Mismatch repair
MRN	Complexe Mre11/NBS1/Rad50
NER	Nucleotide excision repair
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
PinC	Pre-incision complex
RAR β 2	Retinoic acid receptor
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication protein A
RT	Room temperature

SDSA	Synthesis-dependant strand annealing
shRNA	Short hairpin RNA
SID	Small interacting domain
siRNA	Small interfering RNA
ssDNA	Single strand DNA
TC-NER	Transcription coupled NER
TTD	Trichothiodystrophy
UDS	Unscheduled DNA synthesis
WB	Western blot
WT	Wide type
XP	Xeroderma pigmentosum
ZBTB38	Zinc finger and BTB domain-containing protein 38
ZF	Zinc finger

Résumé de la thèse

UNIVERSITE DE STRASBOURG

RESUME DE LA THESE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Ecole doctorale : ED 414 – Sciences de la vie et de la santé

Spécialité (facultative) : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par : Salim ZIANI

Titre : Etude du complexe de réparation par excision de nucléotides

Unité de Recherche : IGBMC - CNRS UMR 7104 - Inserm U 964

Directeur de Thèse : Dr. Frédéric COIN

Localisation : Illkirch

Afin d'assurer sa survie et son fonctionnement, un organisme doit réguler de façon précise dans l'espace et dans le temps l'expression de l'information génétique dont il dispose. Il doit également être capable de maintenir l'intégrité de l'information contenue dans son génome, en réparant toutes les lésions de l'ADN suite à des agressions provenant de l'environnement ou du métabolisme cellulaire. Ces lésions induisent l'arrêt du cycle cellulaire et l'enclenchement d'un mécanisme de réparation adapté, évitant ainsi l'apoptose ou la transformation de la cellule.

Un facteur clé intervient au cœur de processus fondamentaux tels que l'expression et la réparation du génome, il s'agit du facteur de transcription/réparation TFIIH constitué de 2 sous-complexes, le cœur (p62, p52, p44, p34, TTDA, XPB), et le CAK (cdk activating kinase : cdk7, cycline H, MAT1) reliés par l'hélicase XPD. Grâce à sa composition dynamique il est impliqués dans des processus cellulaires distincts (transcription des gènes de classe I et II, réparation de l'ADN et contrôle du cycle cellulaire). En transcription, les dix sous-unités sont présentes dans le facteur, bien que XPD ou TTDA, n'y jouent pas de rôle actif. Lors de la réparation par excision de nucléotides NER qui concerne plusieurs types de lésions déformant la double hélice de l'ADN telles que les 6-4 PP ou les CPD induites par les UV, la reconnaissance des lésions se fait soit par le dimère XPC/hHR23B (impliquant aussi le complexe UV-DDB) dans le cadre du GGR (global genome repair), soit par l'ARN pol II et CSB dans le cadre du TCR (transcription coupled repair). Les deux mécanismes se poursuivent alors de façon similaire par le recrutement de TFIIH et l'ouverture de la double hélice autour de la lésion grâce aux activités hélicases de XPB et XPD, la libération du CAK, et le recrutement de XPA, RPA et des endonucléases XPF-ERCC1 et XPG. Ainsi se forme le complexe de pré-incision (PInC : XPC, TFIIH, XPA, RPA, XPG, XPF-ERCC1) responsable de l'excision d'un fragment de 24 à 32 nucléotides contenant la lésion, qui sera suivie par l'étape de resynthèse et de ligation.

Mon projet de thèse s'est axé sur deux parties, l'étude fonctionnelle de la sous unité TTDA de TFIIH, et le recrutement des facteurs NER en absence de lésions sur l'ADN.

I. La sous-unité TTDA de TFIIH:

Connue pour être impliquée dans la stabilité du complexe TFIIH, TTDA est indispensable à son activité NER, mais pas à celle de transcription. Il a été montré qu'elle existait sous deux formes dans la cellule, une forme complexée à TFIIH et une autre libre circulant entre le noyau et le cytoplasme. Par ailleurs, des mutations dans *TTDA* ont été associées à une maladie autosomale récessive rare, la Trichothiodystrophie de groupe A. Cette maladie se caractérise par une absence totale, ou l'expression d'une forme non fonctionnelle de la protéine, induisant une baisse significative du taux cellulaire de TFIIH et de l'activité NER, ce qui explique la photosensibilité que présentent les patients. Les autres signes cliniques sont des cheveux et ongles cassants dus à un déficit en protéines riches en cystéines, un hypogonadisme, un nanisme cachectique et des troubles neurologiques incluant retard mental, tremblements, spasticité et ataxie, liés à une hypomyélinisation. Le déficit en activité NER ne suffit pas à expliquer tous ces symptômes, comme notamment, les troubles liés à l'hypomyélinisation qui seraient plus probablement dus à un défaut de transcription. Ainsi TTDA ne serait pas impliquée uniquement dans l'activité NER de TFIIH et pourrait interagir sous sa forme libre avec d'autres protéines, dans le cadre de la réparation NER, de la transcription ou même d'autres processus cellulaires. L'objectif de ce projet est donc la mise en évidence de nouvelles interactions de cette protéine, qui permettraient de mieux comprendre la physiopathologie de la trichothiodystrophie de groupe A.

Nous avons d'abord réalisé un crible double hybride, qui nous a fourni une liste de protéines interagissant potentiellement avec TTDA. Afin d'affiner la sélection, nous avons croisé ses résultats avec ceux d'un criblage siRNA réalisé dans le laboratoire et destiné à identifier de nouveaux facteurs NER. Cette stratégie nous a permis de sélectionner ZBTB38 (Zinc finger and BTB domain-containing protein 38), une protéine connue pour être recrutée au niveau des CpG méthylés et pour induire la répression de gènes contenant ces méthylations. Le domaine d'interaction avec TTDA déterminé par le double hybride, correspond au domaine fonctionnel ZnF2 de cette protéine (3 doigts de Zinc centraux, AA 451 à 734).

Par des expériences de pull down et de co-immunoprécipitation, nous avons confirmé que ZBTB38 interagissait avec TTDA par son domaine ZnF2. Des immuno-

fluoromarquages nous ont permis de visualiser le recrutement de ZBTB38 sur les sites de réparation NER et de déterminer qu'il avait lieu après celui de TFIIH et de façon dépendante de TTDA, car il n'avait pas lieu dans des cellules de patients TTD-A. Ce recrutement a été également mis en évidence par une technique de vidéo imagerie *in vivo* sous microscope à fluorescence, après irradiation localisée, en utilisant des cellules exprimant le fragment ZnF2 fusionné à la GFP. Le criblage siRNA ainsi qu'un test de survie aux UV réalisé sur des cellules Hela transfectées par des siRNA ciblant cette protéine, ont montré que l'absence de ZBTB38 entravait le bon déroulement de la réparation NER.

II. Recrutement des facteurs NER sur la chromatine en absence de dommages de l'ADN.

Bien avant l'élucidation de son rôle actif dans la réparation NER, TFIIH était connu pour être impliqué dans la transcription par la RNAPII (initiation, échappée du promoteur et début de l'élongation). Des études récentes viennent de démontrer que d'autres facteurs NER étaient aussi impliqués dans la transcription. XPC, TFIIH, XPA, RPA, XPG et XPF-ERCC1 s'accumulent de façon séquentielle sur le promoteur de gènes transactivés, et ce, en l'absence de lésion de l'ADN. La formation du PInC étant dépendante de la reconnaissance d'une lésion par XPC-hHR23B (ou la RNAPII), ses résultats posent des questions sur le mode d'assemblage des facteurs NER en réparation et en transcription. Afin d'étudier cet assemblage nous avons utilisé un artifice permettant le recrutement d'une protéine sur de la chromatine basé sur le système LacOpérateur/LacRepresseur (LacO/LacR). Nous avons ensuite analysé comment le recrutement forcé et stable de l'un des facteurs NER sur la chromatine pouvait induire l'assemblage du PInC en l'absence de dommage de l'ADN.

Le système LacO/LacR repose sur la fusion d'une protéine d'intérêt avec la région répressive de la protéine LacR bactérienne. En transfectant ces constructions dans des cellules humaines dans lesquelles des séquences répétées de LacO ont été introduites, nous avons provoqué le recrutement stable de facteurs NER sur la chromatine. Les conclusions de ces expériences montrent que l'immobilisation de facteurs NER conduit au seul recrutement des facteurs en aval de façon séquentielle et ordonnée. Nous avons ensuite montré que le facteur TTDA avait un rôle central

dans la formation du PInC car sa présence dans le complexe induit la complétion de ce dernier.

Nous avons également utilisé le système LacO/LacR pour étudier les domaines d'interaction de XPC avec TFIIH. En utilisant des formes tronquées de XPC immobilisées sur la chromatine, nous avons montré que XPC interagissait avec TFIIH au niveau de sa partie N-terminale sur la chromatine, contrairement à ce qui a été montré en solution auparavant.

L'ensemble de ces résultats modifie notre vision de l'assemblage du PInC qui semble pouvoir se former spontanément et de façon ordonnée lorsqu'un facteur NER est immobilisé au niveau de la chromatine en présence ou non de lésions.

Publications:

1. Valentyn Oksenysh, Alexander Zhovmer, **Salim Ziani**, Pierre-Olivier Mari, Jitka Eberova, Tiziana Nardo, Miria Stefanini, Giuseppina Giglia-Mari, Jean-Marc Egly, and Frédéric Coin. "Histone Methyltransferase DOT1L Drives Recovery of Gene Expression after a Genotoxic Attack." *PLoS Genetics* 9, no. 7 (2013): e1003611. doi:10.1371/journal.pgen.1003611.
2. **Salim Ziani**, Zita Nagy, Jean-Marc Egly and Frédéric Coin. "Ordered Assembly of the Nucleotide Excision Repair Complex on Chromatin in the Absence of DNA Damage"
Publication soumise à *Journal of Cell Biology*, en cours de révision.

Communications :

1. Poster, Journées du Campus d'Illkirch (7 et 8 avril 2014, à l'ESBS, Illkirch).

Ordered Self-Assembly of the Nucleotide Excision Repair Complex on Chromatin independently from the presence of DNA damage.

Salim Ziani^{1,3}, Zita Nagy^{1,3}, Evi Soutoglou², Jean-Marc Egly¹ and Frédéric Coin¹

¹IGBMC, Department of Functional Genomics and Cancer, Equipe Labellisée Ligue 2014. CNRS/INSERM/Université de Strasbourg, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, C. U. Strasbourg, France.

²IGBMC, Department of Development Biology and Stem Cells. CNRS/INSERM/Université de Strasbourg, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, C. U. Strasbourg, France.

³These authors contributed equally to this work

Introduction

« We totally missed the possible rôle of... [DNA] repair although...I later came to realise that DNA is so precious that probably many distinct repair mechanisms would exist »

Francis Crick
Nature, 26 avril 1974

Afin d'assurer sa survie et son fonctionnement, un organisme doit réguler de façon précise dans l'espace et dans le temps l'expression de l'information génétique dont il dispose. Il doit également être capable de maintenir l'intégrité de l'information contenue dans son génome, car l'ADN est constamment sujet à des altérations, provenant de l'environnement ou de la cellule elle-même. S'ils persistent, ces dommages peuvent induire des mutations résultant de substitutions de bases ou de petites insertions/délétions, ainsi que des réarrangements chromosomiques. Une telle instabilité génomique constitue une étape essentielle dans le développement de cancers en inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs ou en activant des proto-oncogènes. Ainsi, pour contrecarrer l'accumulation potentielle de lésions, les organismes vivants ont développé des systèmes de protection physiques (la peau) ou biochimiques (les vitamines) leur permettant d'éviter l'endommagement de l'ADN. Ces systèmes sont cependant perméables et des lésions se forment en permanence sur le génome. Les cellules ont ainsi développé au cours de l'évolution de multiples systèmes de réparation de l'ADN, qui prennent en charge les différents types de lésions, et assurent l'intégrité de l'information génétique. D'un autre côté ces mécanismes interviennent également dans la réparation des lésions de l'ADN induites par un grand nombre d'agents anticancéreux et peuvent contribuer au phénotype de résistance clinique à ces médicaments. Les mécanismes de réparation de l'ADN jouent un rôle crucial dans l'efficacité des chimiothérapies anticancéreuses et sont apparus très tôt comme des cibles potentielles pour le développement de nouveaux composés cytotoxiques.

Dans notre laboratoire nous étudions le système de réparation par excision de nucléotides (NER), qui est associé à trois maladies génétiques rares : le Xérodérma pigmentosum, le Syndrome de Cockayne et la Trichothiodystrophie. Durant ma thèse j'ai travaillé sur deux projets qui concernent ce système de réparation, d'un côté l'étude de la sous-unité TTDA du facteur de transcription/réparation TFIIH, et de l'autre l'étude du recrutement des facteurs NER sur la chromatine en utilisant un système artificiel nous permettant de nous affranchir de l'effet des dommages de l'ADN sur la formation du complexe.

L'objectif du premier projet a été d'identifier de nouveaux partenaires de la sous-unité TTDA de TFIIH, afin de mieux appréhender ses fonctions, que ce soit sous sa forme libre ou liée à TFIIH. La première étape a été la réalisation d'un

criblage double hybride dont nous avons croisé les résultats avec ceux d'un criblage siRNA /NER. Nous avons ainsi pu sélectionner la protéine ZBTB38 et avons ensuite confirmé par différentes techniques son interaction avec TTDA et son implication dans la réparation NER.

Le deuxième projet visait à mieux comprendre le mécanisme moléculaire régissant le recrutement des facteurs NER sur la chromatine, et le rôle de la lésion dans la formation du complexe de pré-incision (PInC). Notre stratégie a consisté en l'utilisation d'un système rapporteur basé sur le Lac Operateur/Lac Répresseur (LacO/LacR), afin de forcer le recrutement de facteurs NER sur la chromatine en absence de dommages de l'ADN, et d'analyser ensuite l'assemblage du PInC par immunofluorescence. Nous avons observé que l'immobilisation de l'un des facteurs NER sur la chromatine non endommagée induisait un assemblage séquentiel et ordonné du PInC. Nous avons montré aussi que la sous-unité TTDA de TFIIH jouait un rôle clé en permettant le recrutement de XPA. Nous avons constaté que cette dernière interagissait avec la partie N-terminale de TTDA (tronquée chez certains patients TTD-A). En plus des connaissances sur la formation du PInC, ces résultats nous montrent que le système LacO/LacR peut être utilisé afin de comprendre des défauts moléculaires associés à des situations pathologiques.

I. Dommages subis par l'ADN

Divers types de lésions apparaissent sur l'ADN, elles peuvent être d'origine endogène ou exogène. Afin de maintenir l'intégrité du génome, il existe différents systèmes de réparations prenant en charge de façon spécifique une ou plusieurs lésions.

Parmi les agents endogènes on retrouve, (1) les espèces réactives oxygénées (ROS) qui proviennent de la respiration oxydative et de la peroxydation lipidique (ions superoxydes, radicaux hydroxyles, peroxyde d'hydrogène). Elles peuvent directement réagir avec la molécule d'ADN et former plus de 100 lésions oxydatives différentes dont la plus fréquente est la 8-oxoguanine (fig. 1A). (2) L'apparition spontanée de sites abasiques suite à la rupture de la liaison glycosidique entre la base et le désoxyribose qui peuvent induire des cassures simple brin. (3) Les désaminations spontanées qui convertissent cytosine, adénine, guanine ou 5-méthylcytosine en uracile, hypoxanthine, xanthine et thymine, entraînant une suppression de l'information codante. Et enfin (4) on retrouve les altérations liées à des dysfonctionnements de certaines ADN polymérases qui se traduisent par l'apparition d'un mésappariement ou mismatch, ainsi que certaines bases méthylées comme la 7-méthylguanine ou la 3-méthyladénine qui résultent d'une méthylation accidentelle de l'ADN par des cofacteurs enzymatiques tels que la S- adénosylcystéine (Hoeijmakers, 2001; Pourquier, 2006).

Les lésions d'origine exogène sont principalement liées à des facteurs environnementaux comme les rayonnements ultra-violet de la lumière solaire qui induisent le pontage de thymines adjacentes et conduisent à des adduits de type dimères de cyclopyrimidines (CPD) ou photo-produits 6,4 (6-4PP) (figure 1B). Les radiations ionisantes, provoquant l'altération du squelette sucre-phosphate, la formation de sites abasiques, des cassures simple et double brins mais aussi des modifications de bases. Certaines substances génotoxiques présentes dans la fumée de cigarette ou dans divers rejets industriels sont également capables de former des adduits plus ou moins volumineux de l'ADN, c'est le cas notamment des adduits de benzopyrène. Enfin, certains médicaments anticancéreux comme le cisplatine génèrent des pontages intrabrins alors que les inhibiteurs d'ADN-

topoisomérases induisent des cassures simple ou double brin (figure 1B) (Hoeijmakers, 2001; Pourquier, 2006).

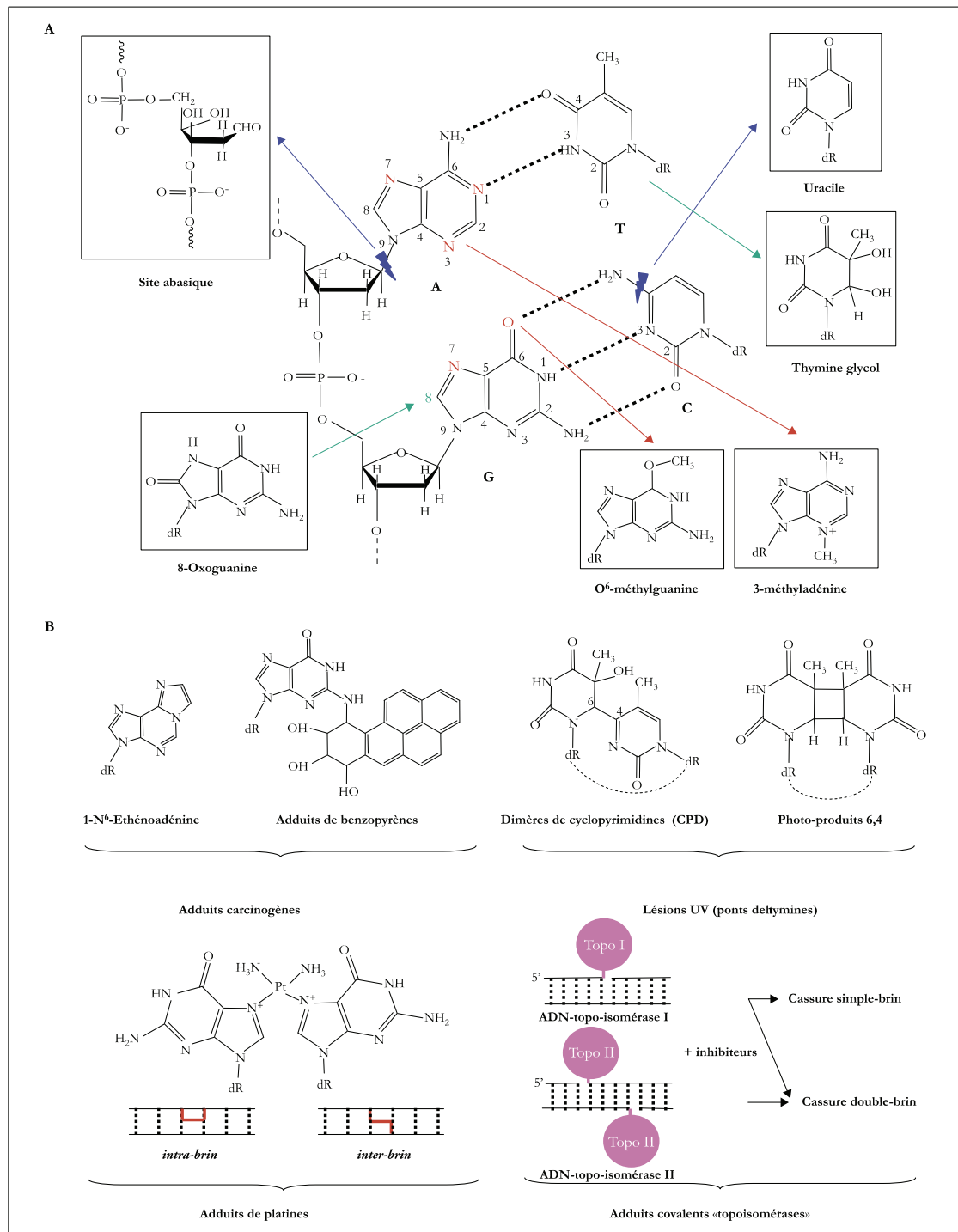


Figure 1 : Principales lésions de l'ADN.

A) Lésions majoritaires issues de l'excision ou de la déamination des bases (flèches bleues), du métabolisme oxydatif (flèches vertes) ou de l'alkylation des bases (flèches rouges). B) Adduits volumineux issus de la réaction des bases avec des agents carcinogènes, les rayonnements ultraviolets ou des anticancéreux dérivés du platine ou inhibiteurs de topoisomérases (Pourquier, 2006).

II. Les systèmes de réparation

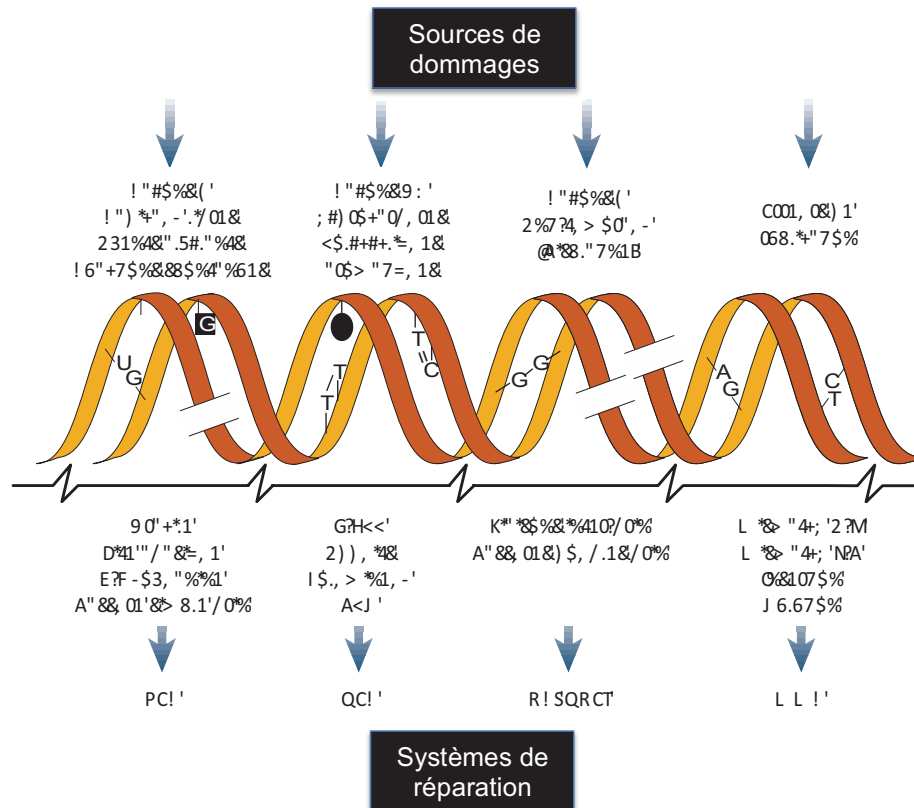


Figure 2 : Différents systèmes de réparation prenant en charge différents types de dommages (Hoeijmakers, 2001).

II.1. Réparation par réversion directe

Ce système fait intervenir une seule protéine, la O6-méthylguanine methyltransferase (MGMT) qui catalyse le transfert sur l'une de ses cystéines, du groupement méthyle de l'oxygène en position 6 de la O6-méthylguanine. Cette réaction est irréversible et induit l'ubiquitination de la MGMT puis sa dégradation par le protéasome. Ce type de lésion est très mutagène, et dans certains cas cytotoxique puisqu'elle est capable de s'apparier avec la thymine et d'induire plusieurs cycles inefficaces de réparation MMR qui aboutissent à l'apoptose (Iyama and Wilson III, 2013; Kaina et al., 2007).

II.2. Réparation par excision de bases BER

Ce système intervient principalement dans la réparation des lésions oxydatives liées au métabolisme cellulaire, mais prend aussi en charge les cassures

simple brin induites par les radiations ionisantes. Les ADN glycosylases y jouent un rôle crucial, elles sont responsables du clivage de la liaison N-glycosidique entre la base et le désoxyribose (fig 3 I). Il en résulte un site apurique/apirimidique (AP) au niveau duquel l'endonuclease APE1 provoque une incision (fig 3 II). Lorsque la BER est initiée par une cassure simple brin, la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et la kinase PNK sont recrutées pour protéger les extrémités du brin (fig 3 III). Le résidu désoxyribose phosphate est ensuite excisé et le nucléotide resynthétisé par l'ADNpol β (fig 3 IV, V), s'en suit alors la ligation par le complexe XRCC1-ligase III (fig 3 VI). La voie Long-patch, moins importante que celle précitée, fait intervenir l'ADNpol β , ADNpol δ/ϵ et PCNA pour la resynthèse, l'endonucléase FEN1 pour inciser le fragment déplacé et l'ADN ligase I pour la ligation (fig 3 VII-IX)(Hoeijmakers, 2001).

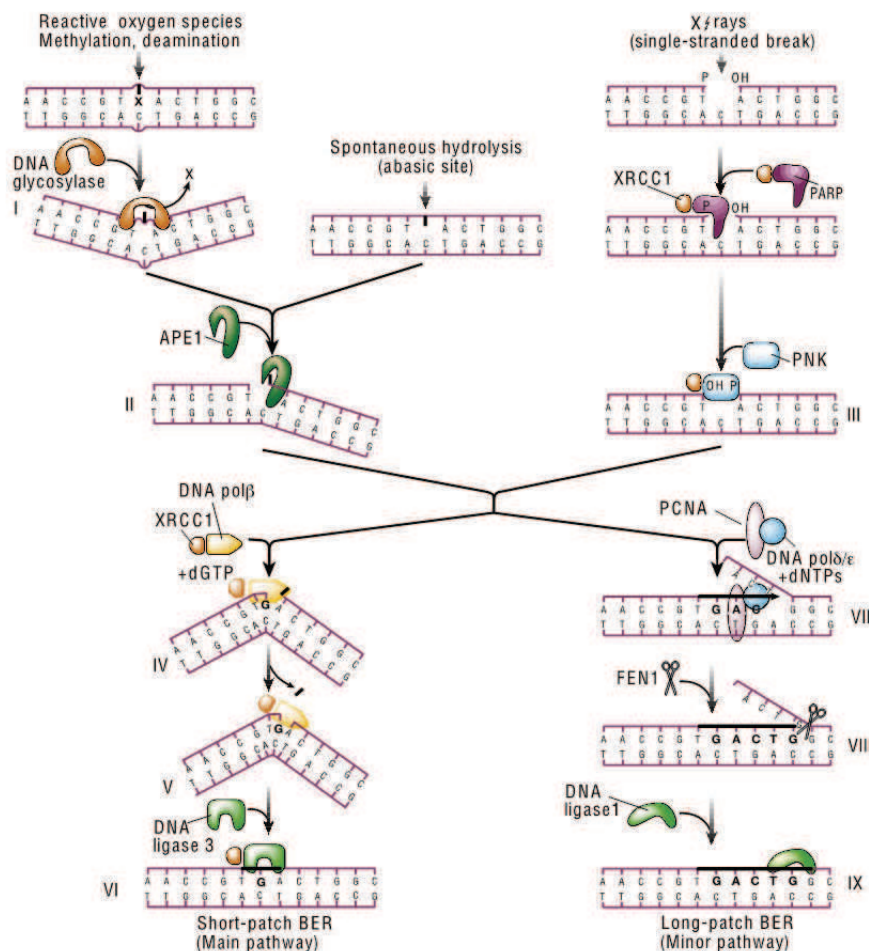


Figure 3 : Mécanisme de la réparation par excision de base (BER). (Hoeijmakers, 2001).

II.3. Réparation des mésappariements MMR

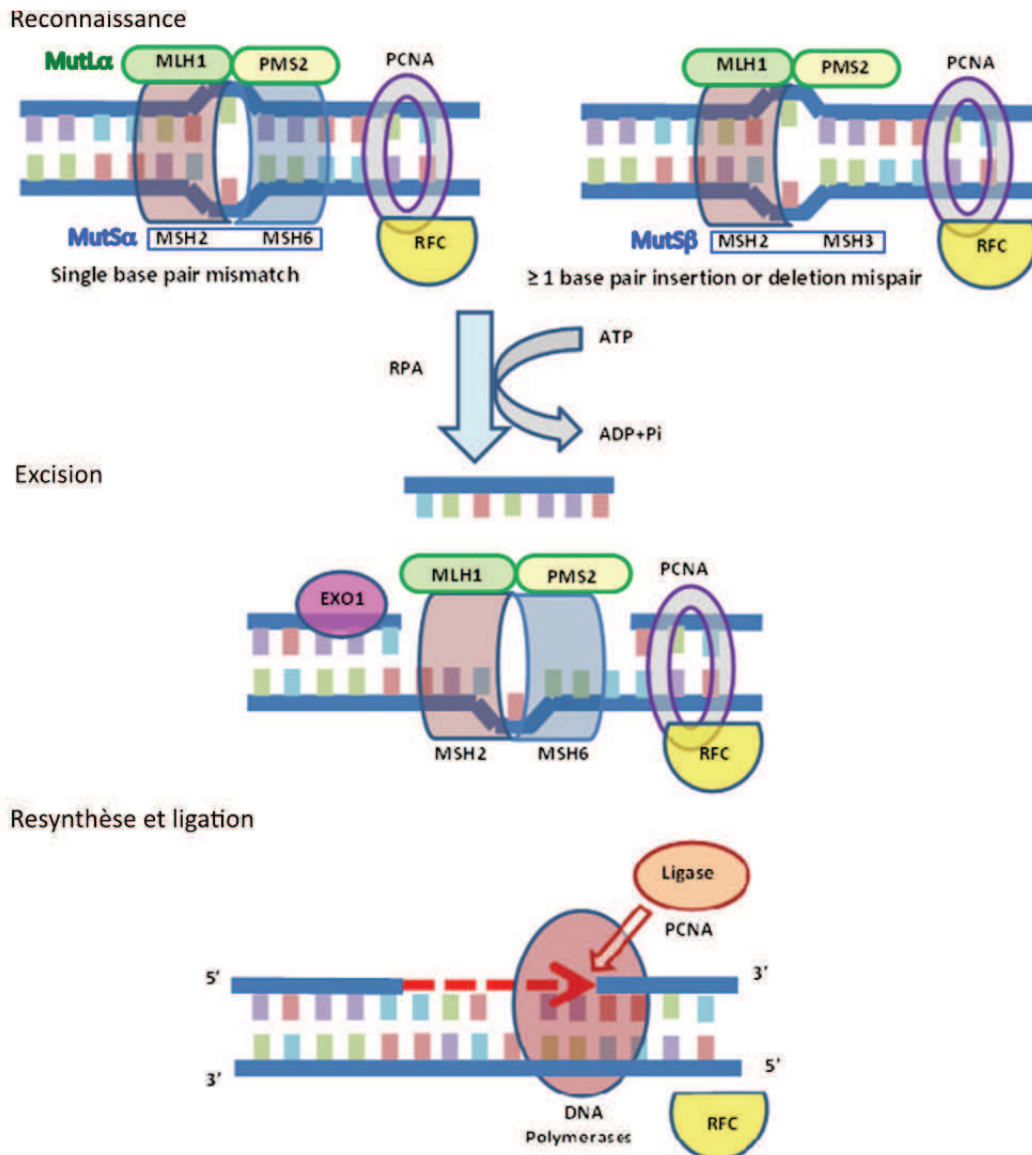


Figure 4 : Mécanisme de la réparation MMR.

Les complexes MutS α (hMSH2/6) et MutS β (hMSH2/3) reconnaissent le mésappariement, induisant le recrutement de MutL α (MLH1/PMS2). PCNA est recrutée par RFC. L'activité endonucléase de PMS2 permet l'incision, elle fait intervenir RPA et Exo1 également. L'ADN pol δ et la ligase I agissent dans l'étape de resynthèse et ligation. (Xiao et al., 2014)

Cette voie de réparation est activée par la présence de bases mal appariées provenant d'erreurs d'incorporation par les ADN polymérase, et des insertions/délétions (d'une à plusieurs bases) résultant de glissements réplicatifs au niveau des séquences répétitives, ou lors de recombinaisons. Elle est organisée en quatre étapes principales : (1) reconnaissance du mésappariement, (2) recrutement d'autres facteurs MMR, (3) identification du brin (néosynthétisé) portant l'erreur, et

dégradation au niveau du mésappariement, et enfin (4) resynthèse du brin excisé et ligation (Hoeijmakers, 2001). (fig. 4)

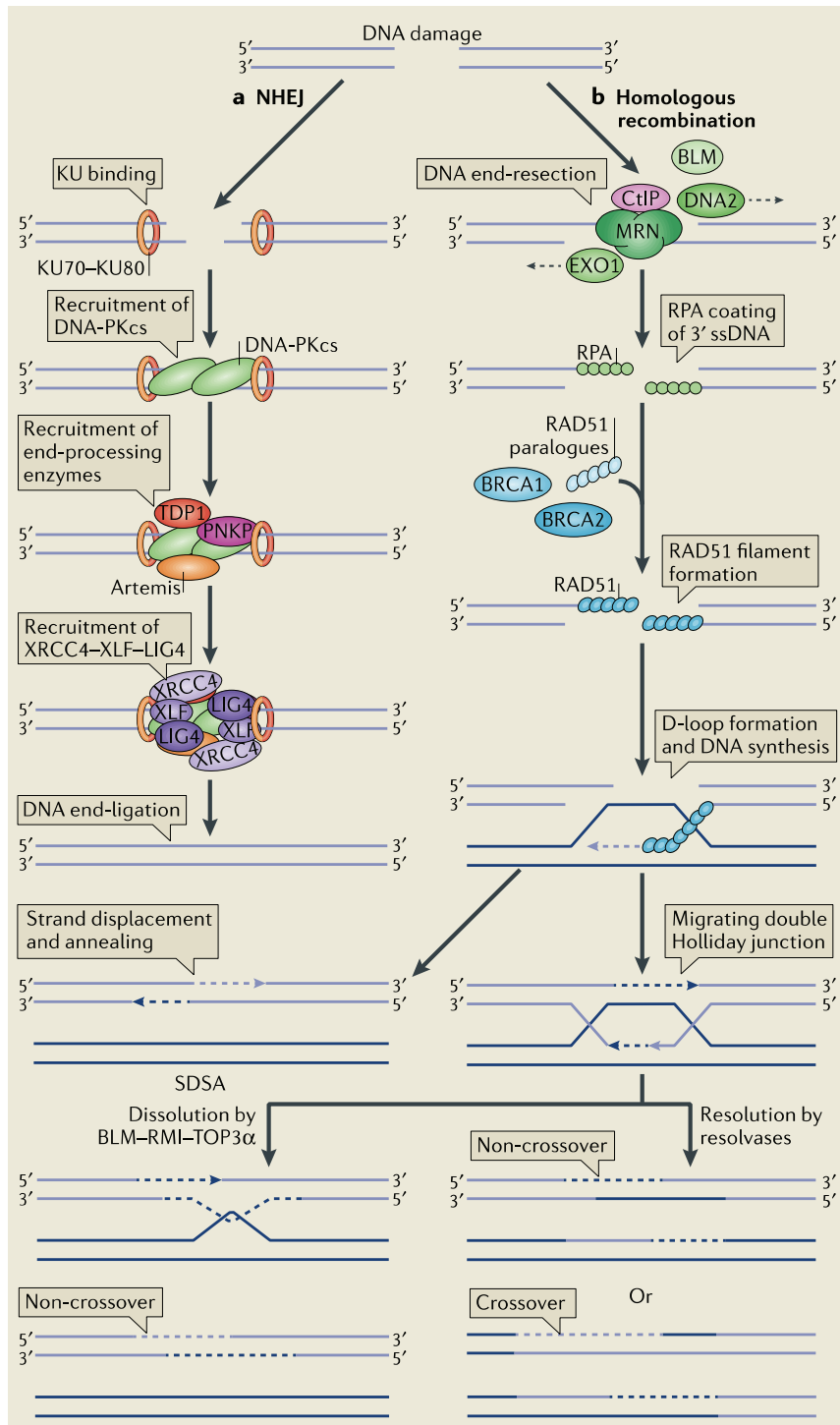
L'hétérodimère hMutS α (hMSH2/6) reconnaît les mésappariements et les insertions d'une base, et le dimère hMutS β (hMSH2/3) les insertions/délétions de plusieurs bases (Larrea et al., 2010). L'hétérodimère MutL α (hMLH1/hPMS2) permet le recrutement des autres protéines impliquées dans les phases d'excision et de resynthèse (PCNA, exonuclease1, RPA, RFC, pol δ , ligase I) (Hoeijmakers, 2001). Il interagit aussi avec les complexes MSH et la machinerie de réplication, ce qui est important pour la discrimination du brin néosynthétisé : pour le brin direct (au cours de la réplication), PCNA oriente l'incision induite par hMutL α et stimule son activité endonucléase. Pour le brin indirect, il a été proposé que la discrimination se fait par la reconnaissance des terminaisons 5' des fragments d'Okazaki existants (Iyama and Wilson III, 2013).

II.4. Réparation des cassures double brin

Les cassures double brin (DSB) sont induites par les radiations ionisantes, les rayons X, les radicaux libres, certains agents chimiques et par la réplication de certaines cassures simple brin. La détection d'un DSB enclenche une cascade de réactions ayant pour but l'arrêt du cycle cellulaire et le recrutement des facteurs de réparation pour former des foci de réparation. Cette cascade inclut le complexe MRN, MDC1 et 53BP1, suivi par les phosphatidylinositol 3 kinases ATM/DNAPK/ATR, qui à leur tour phosphorylent le variant d'histone H2AX et les effecteurs en aval tels que les kinases Chk1 et Chk2 (Soutoglou and Misteli, 2008). La réparation des DSB se fait par deux principales voies, la recombinaison homologue et la recombinaison non homologue par jonction d'extrémités (NHEJ) (fig. 5).

La voie NHEJ est initiée par la liaison de l'hétérodimère KU70-KU80 aux extrémités de l'ADN, suivie par le recrutement et l'activation de la kinase DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) dont le rôle est de maintenir à proximité les deux extrémités de la cassure, et de recruter et phosphoryler Artemis, ce qui stimule son activité 3'et 5' exonucléasique nécessaire à la préparation des extrémités d'ADN, avant ligation par le complexe XRCC4-ligase IV qui est chargé de

restaurer la continuité de la double hélice (Panier and Boulton 2014)



a. Recombinaison homologue (HR), et b. recombinaison non homologue par jonction d'extrémités (NHEJ) (Panier and Boulton, 2014).

Alors que la voie NHEJ est active le long du cycle cellulaire, la recombinaison homologue n'agit que lors des phases S et G2 parce qu'elle nécessite l'utilisation de la séquence homologue sur la chromatide sœur comme modèle pour la resynthèse

de l'ADN endommagé. Cette voie implique le recrutement du complexe MRN (Mre11, Nbs1 et Rad50) au niveau des extrémités de la cassure. Sa phosphorylation par ATM stimule son activité 5'-3' exonucléasique et permet la formation de deux extrémités simple brin 3' protrusives, qui sont immédiatement protégées de l'action d'autres nucléases par recouvrement de RPA (Pourquier, 2006). D'autres nucléases sont également impliquées (BLM, CtIP, EXO1, DNA2). RAD51 est un facteur clé dans cette voie, il permet le déplacement de RPA et la formation de nucléofilaments RAD51-ssDNA, avec l'aide de BRCA1, BRCA2 et plusieurs paralogues de RAD51. Ceci permet la reconnaissance de la séquence homologue sur la chromatide sœur et la formation d'une loupe d'invasion de brin (D-loop), dans laquelle a lieu la resynthèse de l'ADN remplaçant la lésion. Enfin, en fonction du type de recombinaison homologue, la D-loop est défaite soit par la dissociation de l'un des brins envahisseurs (SDSA), ou bien par la formation d'une structure intermédiaire appelée jonction d'Holliday qui sera clivée par l'action de résolvas, ou défaite par le complexe RMI-TOP3 α (Panier and Boulton, 2014).

II.5. Réparation par excision de nucléotides NER

Le système NER cible plusieurs types de lésions, incluant les CPD et 6-4PP générées par les UVs, différents adduits générés par les agents chimiques tels que le cisplatine et le bezopyrene, ainsi que des lésions induites par les produits de peroxydation des lipides et les ROS comme les cyclopurines. La caractéristique commune à toutes ces lésions est la génération d'une distorsion de la double hélice d'ADN, ce qui permet leur reconnaissance par le système NER (Gillet and Schäfer, 2006). Ainsi, les lésions 6-4PP qui induisent une courbure de 44° de la molécule d'ADN, sont réparées plus rapidement que les lésions CPD qui ne génèrent qu'une légère courbure d'environ 15° (Reardon and Sancar, 2003).

Il existe deux voies de réparation NER, la GG-NER (global génome NER) qui agit sur la totalité du génome, et la TC-NER (transcription coupled NER) qui répare les lésions apparaissant sur les régions activement transcrites (Tornaletti and Hanawalt, 1999). Ces deux voies se différencient par l'étape de reconnaissance de la lésion sur l'ADN et se rejoignent ensuite en un mécanisme commun : ouverture de l'ADN autour de la lésion, double incision du brin endommagé, resynthèse puis ligation (fig. 6).

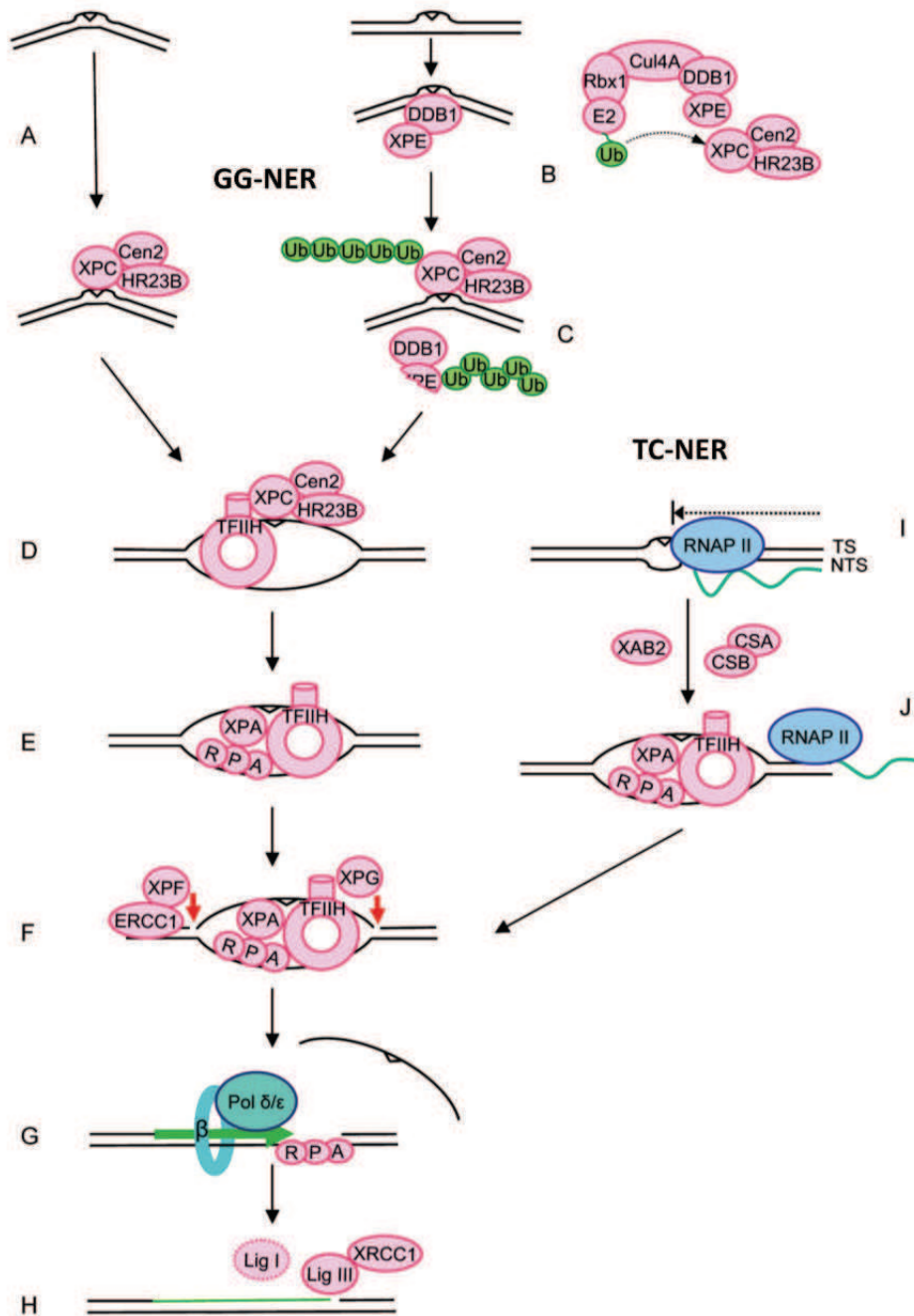


Figure 6 : Mécanismes de la réparation NER. (Nospikel, 2009)

(A) Reconnaissance du dommage par XPC/hHR23B dans la voie GG-NER. (B) Reconnaissance le complexe DDB des lésions induisant une faible distorsion, (C) L'ubiquitination de XPC augmente son affinité pour l'ADN, alors que l'ubiquitination de XPE (DDB2) permet sa dégradation, (D) TFIIH permet l'ouverture de l'ADN au niveau de la lésion, (E) recrutement de RPA/XPA et libération de XPC, (F) incision en 5' et 3' de la lésion par XPF/ERCC1 et XPG, (G) resynthèse de la partie excisée du brin endommagé, et (H) ligation. (I) blocage de l'ARNPII par la lésion induisant la voie TC-NER, (J) recrutement de CSB, CSA, XAB2 et les autres facteurs NER.

II.5.a. La voie GG-NER :

La reconnaissance de la lésion : c'est la protéine XPC qui reconnaît la distorsion de l'ADN induite par la lésion. Elle existe dans la cellule sous forme d'un hétérotrimère XPC/hHR23B/Centrin2 où l'interaction de XPC avec ces deux protéines joue un rôle important dans la stabilité du complexe et l'activité de reconnaissance de l'ADN endommagé. La Centrin2 n'est pas indispensable dans une réaction NER *in vitro* (Sugasawa, 2011). Le complexe UV-DDB intervient également dans la reconnaissance de certaines lésions, il comporte DDB1 et DDB2, cette dernière a une affinité significative pour les CPD facilitant leur reconnaissance par le complexe XPC (Wittschieben et al., 2005). En interagissant avec le complexe CUL4/ROC1, DDB1 provoque l'ubiquitination de DDB2 (et sa dégradation par le protéasome) et de XPC ce qui stimule la liaison de cette dernière à l'ADN et l'activité NER (Li et al., 2006).

L'ouverture de l'ADN autour de la lésion : Cette étape de la réaction NER met en jeu le facteur de transcription TFIIH, un complexe de dix sous-unités (XPB, XPD, P62, P52, P44, P34, TTDA, Cycline H, cdk7 et MAT1). Il est impliqué dans l'initiation de la transcription par l'activité hélicase de la sous-unité XPB permettant l'ouverture du promoteur (Bradsher et al., 2000), et par l'activité kinase du sous-complexe CAK (cyclin-activated kinase) composé de la cycline H, cdk7 et MAT1 qui induisent la phosphorylation de l'ARNPII permettant son échappée du promoteur (Hirose and Ohkuma, 2007). Le CAK permet aussi la phosphorylation de plusieurs récepteurs nucléaires tels que les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) (Keriel et al., 2002).

Dans la réparation NER ce n'est pas l'activité hélicase de XPB mais son activité ATPase qui est requise (Coin et al., 2007) avec l'activité hélicase de XPD pour l'ouverture de l'ADN au niveau de la lésion (Winkler et al., 2000). Il a été montré que l'activité ATPase de XPB est stimulée par l'interaction de TFIIH avec XPC/hHR23B, et aussi par la sous-unité TTDA à travers son interaction avec p52 (sous-unité régulatrice de l'activité ATPase de XPB au sein du TFIIH) (Coin et al., 2007; Oksenysh and Coin, 2010). En ce qui concerne XPD, son activité hélicase est régulée par l'interaction de la sous-unité p44 avec son extrémité C-terminale (Oksenysh and Coin, 2010).

Une fois l'ADN ouvert par TFIIH, RPA est recrutée afin de protéger le brin non endommagé de la potentielle dégradation par les nucléases, suivie de XPA dont le recrutement est favorisé par la sous-unité TTDA de TFIIH (Coin et al., 2006), ceci va induire la dissociation du sous-complexe CAK de TFIIH (Coin et al., 2008), et la libération de XPC/hHR23B (Hey et al., 2002; You et al., 2003).

La double incision : Cette étape commence par le recrutement des endonucléases XPG et XPF/ERCC1 complétant la formation du PInC (complexe de pré-incision : TFIIH, XPA, RPA, XPG et XPF/ERCC1). XPF induirait la libération de TFIIH (Riedl et al., 2003), et provoque avec XPG des coupures en 5' et 3' respectivement, excisant un fragment de 24 à 32 nucléotides autour de la lésion (Hess et al., 1997).

La resynthèse et la ligation : La partie excisée du brin endommagée est resynthétisée par les ADN polymérases δ/ϵ en association avec PCNA. Enfin, la ligase I et la ligase III avec son partenaire XRCC1 permettent de lier le brin néosynthétisé avec l'ADN préexistant (Nospikel, 2009).

II.5.b. La voie TC-NER :

Dans une réaction TC-NER, la reconnaissance de la lésion se fait par l'arrêt de l'ARN polymérase II en cours d'élongation (ARNPIIo) (Svejstrup, 2002). Cette voie ne nécessite donc pas les complexes XPE et XPC/hHR23b. L'arrêt de l'ARNPIIo stabilise son interaction avec CSB qui joue un rôle clé dans le recrutement de CSA et de la machinerie NER mais aussi du facteur d'épissage XAB2, du facteur de remodelage de la chromatine p300 et une protéine d'interaction nucléosomale HMGN1 (ces protéines faciliteraient le remodelage de la chromatine et permettraient la translocation de l'ARNPIIo pour favoriser la réparation et le redémarrage de la transcription par la suite). CSA est recrutée sous forme d'un complexe CSA/DDB1 E3-ub ligase/CSN (dont l'activité E3-ub ligase est inactive, et dont le rôle est ici de protéger l'ARNPIIo de l'ubiquitination et de la dégradation afin de permettre la reprise de la transcription après réparation). CSA est requise pour le recrutement de HMGN1, XAB2 et du facteur de transcription TFIIIS (Fousteri et al., 2006).

Une fois la lésion reconnue et le complexe de pré-incision formé, CSB est ubiquitinée et relarguée avec TFIIH et XPA (Groisman et al., 2006). Les étapes suivantes se déroulent ensuite de la même manière que dans la voie GG-NER.

II.6. Pathologies liées au système NER

II.6.a. Le Xeroderma pigmentosum (XP) : Il s'agit d'une maladie autosomale récessive rare, caractérisée par une photosensibilité et une forte prédisposition aux cancers de la peau et des muqueuses, résultant d'un défaut de réparation des lésions UV-induites (DiGiovanna and Kraemer, 2012). De plus, les patients XP montrent une forte prédisposition aux cancers internes, principalement des poumons et du tractus gastro-intestinal, qui seraient dus aux polluants atmosphériques et aux carcinogènes alimentaires (Kraemer et al., 1984). Environ 20% des patients développent des symptômes neurologiques liés à une neurodégénérescence, (microcéphalie, retard mental, ataxie cérébrale) probablement dus à un défaut de réparation des lésions oxydatives (Rapin et al., 2000).

Huit différents groupes de complémentation génétique ont été identifiés, représentant les protéines du système NER (de XP-A à XP-G), ainsi qu'une forme variante qui concerne une ADN polymérase translésionnelle (XP-V) (Iyama and Wilson III, 2013). Les formes XP-C et XP-E induisent des symptômes moins sévères que les autres groupes, peut être en raison d'une voie TC-NER qui fonctionne normalement (Nospikel, 2009).

II.6.b. Le syndrome de Cockayne (CS) : Ce syndrome est caractérisé principalement par des troubles neurologiques et du développement, induisant une durée de vie très réduite, mais il ne présente pas de prédisposition aux cancers (Nance and Berry, 1992). L'exposition au soleil induit des érythèmes et une inflammation sévère bien que des cas de CS sévères sans photosensibilité aient été rapportés (Colella et al., 1999).

Le CS englobe plusieurs syndromes avec différents degrés de sévérités : le syndrome UVSS (UV-sensitive syndrome) dont le seul symptôme est la photosensibilité, les syndromes CS I et CS II présentant nanisme cachectique, rétinopathie, microcéphalie, surdité, troubles neurologiques, démyélinisation, calcification ganglionnaire et retard de la croissance et du développement après la

naissance, et enfin le très sévère syndrome COFS (cérébro-oculo-facio-squelettique) qui induit une mort néonatale (Nance and Berry, 1992).

L'analyse génétique a défini deux groupes de complémentations CS-A et CS-B impliquant deux protéines spécifiques à la voie TC-NER, ce qui explique l'incapacité des cellules des patients à recouvrer la transcription après exposition aux UVs, alors que la voie GG-NER n'est pas altérée (Cleaver et al., 2009). Il existe un groupe appelé XP/CS dans lequel les patients présentent des symptômes des deux syndromes, les mutations impliquées concernent XPB, XPD et XPG (Lindenbaum et al., 2001).

II.6.c. La Trichothiodystrophie (TTD): Les symptômes de la TTD varient entre des cas peu sévères avec seulement les ongles et cheveux cassants (dus à un déficit en protéines riches en cystéine, et constituant le diagnostic différentiel de cette maladie (Itin et al., 2001)), jusqu'aux cas plus sévères présentant de graves troubles du développement, des infections récurrentes et une mortalité élevée à un jeune âge. La TTD est souvent caractérisée par des complications durant la grossesse et à la naissance, indiquant le rôle important de la réparation NER au cours du développement fœtal (Faghri et al., 2008). L'examen par neuro-imagerie a révélé que le caractère le plus commun de la TTD est l'hypomyélinisation, qui semble être due à un défaut développemental (dysmyélinisation) et non à une perte de la myéline (démélinisation). Aucune dégénérescence neuronale n'a été observée chez les patients TTD (Hashimoto and Egly, 2009).

Plusieurs groupes de TTD ont été identifiés selon les gènes affectés et la réponse cellulaire aux UVs : une forme non photosensible impliquant le gène *TTDN1* (*C7orf11*) (Botta et al., 2007), et les formes photosensibles plus sévères dues à des mutations touchant trois sous-unités de TFIIH : XPB, XPD et TTDA (groupes TTD-B, TTD-D et TTD-A), elles sont caractérisées par une baisse de 70% du taux cellulaire de TFIIH (Botta et al., 2002; Giglia-Mari et al., 2004).

Trois mutations de *TTDA* ont été identifiées chez les patients TTD-A : M1T, L21P et R56Stop, elles induisent des phénotypes relativement modérés, les cellules présentent une sensibilité modérée aux UVs et leur activité NER n'est pas

complètement abolie mais seulement ralentie (Giglia-Mari et al., 2004; Theil et al., 2011).

II.7. Sous-unité TTDA de TFIIH

TTDA est la dernière sous unité à avoir été identifiée dans TFIIH, c'est également la plus petite. Il s'agit d'une protéine de 71 acides aminés, caractérisée par un équilibre entre une forme homodimérique libre diffusant entre le noyau et le cytoplasme, et une forme liée au TFIIH vers laquelle se déplace l'équilibre lorsque le système NER intervient pour éliminer des lésions de l'ADN (Giglia-Mari et al., 2006; Vitorino et al., 2007a).

Il a été observé qu'elle n'avait qu'un rôle limité dans la transcription basale, mais qu'elle était indispensable à l'activité NER (Giglia-Mari et al., 2006). Notre laboratoire a montré qu'elle était nécessaire pour l'ouverture de l'ADN autour de la lésion car elle stimule l'activité ATPase de XPB, probablement par l'intermédiaire de son interaction avec la sous-unité p52 (Coin et al., 2006). L'interaction entre TTDA, p52 et XPB a été démontrée par complémentation génétique chez la drosophile : la surexpression de TTDA supprime le phénotype létal des mutations des gènes *Dmp52* (homologue de *p52*) et *haywire* (homologue de *XPB*) (Aguilar-Fuentes et al., 2008).

Chez les patients TTD-A, trois mutations différentes du gène *TTDA* ont été identifiées (**fig. 7**). La mutation M1T convertit le codon d'initiation ATG en ACG, la méthionine en position 16 sera alors utilisée comme codon d'initiation, induisant une délétion N-terminale incluant le feuillet $\beta 1$ impliqué dans la dimérisation de la protéine. La mutation L21P touche un domaine hydrophobe localisé à la surface de la protéine probablement impliqué dans la reconnaissance des partenaires moléculaires. Enfin, la mutation R56Stop induit la troncation de la partie C-terminale qui ne semble pas perturber la conformation de la protéine (**fig. 8**) (Vitorino et al., 2007a). Toutes ces mutations se manifestent par une réduction significative de la concentration cellulaire en TFIIH due à une faible stabilité du complexe (Giglia-Mari et al., 2004). Il a été montré que la surexpression de *TTDA* restaurait le taux de TFIIH dans des cellules humaines TTD-A ou TTD/XP-D, ainsi que dans des cellules de drosophiles mutées pour *Dmp52* (homologue de *p52*), d'autre part sa sous-expression induit une baisse significative du taux de TFIIH dans des cellules

normales, ces données confirment le rôle de TTDA dans la stabilité de TFIIH (Coin et al., 2006).

Les cellules de patients TTD-A sont caractérisées par une sensibilité modérée aux UV (Giglia-Mari et al., 2004), et une activité NER ralentie par rapport aux cellules WT, observée lors de la mesure cinétique de l'activité UDS (unscheduled DNA synthesis), et du taux de réparation des lésions 6-4PP. Ce défaut n'est pas dû au faible taux de TFIIH, mais à sa constitution chimique et physique qui ne permet pas dans ce cas, le recrutement normal des autres facteurs en aval (Theil et al., 2011).

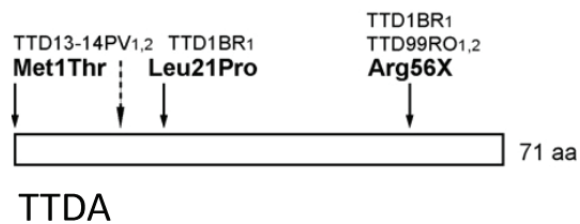


Figure 7 : Mutations identifiées chez les patients TTD-A

Les chiffres 1 et 2 après les codes représentant les patients indiquent les allèles. La flèche en pointillés indique la méthionine en position 16 qui peut être utilisée pour initier la traduction chez les patients TTD13/14PV résultant en une protéine tronquée en N-terminal.

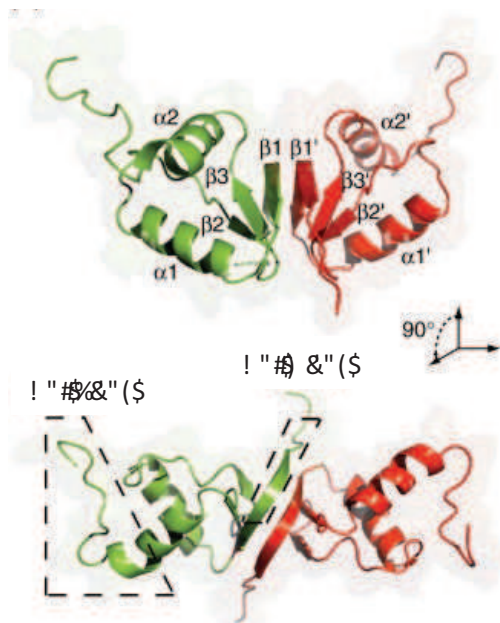


Figure 8 : Représentation de la structure de TTDA

Les pointillés représentent les parties N-terminales ou C-terminales tronquées en cas de mutations M1T et R56Stop

Partie I : Sous-unité TTDA de TFIH.

Le défaut de réparation NER induit par les mutations présentes chez les patients TTD-A ne permet pas à lui seul d'expliquer tous les symptômes de la maladie, comme notamment, les troubles du développement liés à une hypomyélinisation qui serait plus probablement due à un défaut de transcription (Hashimoto and Egly, 2009). Ces données suggèrent que TTDA n'est pas impliquée uniquement dans l'activité NER du TFIIH, et ce d'autant plus qu'on sait qu'elle existe sous deux formes dans la cellule, une complexée au TFIIH et une autre libre circulant entre le noyau et le cytoplasme, Cette dernière forme pourrait interagir avec d'autres protéines dans le cadre de la réparation NER, de la transcription ou même d'autres processus cellulaires. C'est dans cette perspective que nous avons décidé d'effectuer un criblage double hybride avec pour cible TTDA et de croiser les résultats obtenus avec ceux d'un criblage siRNA effectué au laboratoire afin de mettre en évidence de nouvelles protéines de la NER. Nous avons ainsi identifié ZBTB38, une protéine connue pour sa capacité à se lier à l'ADN méthylé comme un partenaire de TTDA ayant un rôle dans la NER.

MATERIEL ET METHODES

Crible double hybride :

Le criblage double hybride chez la levure (Y2H) est une technique d'identification des interactions protéiques, réalisée par la transformation séquentielle d'un appât et ensuite de la banque, l'appât consiste en une fusion de la protéine étudiée au DBD d'un facteur de transcription, et la banque comporte le domaine activateur fusionné aux protéines cibles. Le facteur de transcription régule l'expression d'un marqueur d'auxotrophie (HIS3 histidine), qui ne sera exprimé que si il y a interaction entre la protéine appât et une protéine cible mettant à proximité le domaine activateur et le DBD. Pour notre étude le criblage a été réalisé par la société bio-pharmaceutique Hybrigenics[®], avec une version optimisée ULTimate Y2H[®], qui consiste à constituer des cellules diploïdes par conjugaison de deux levures de type sexuel opposé et exprimant la protéine appât (séquence complète de la protéine TTDA) ou les protéines proies (banque de cDNA de placenta humain).

Lignées cellulaires :

Hela shCtrl, shZBTB38 et shXPA, sont cultivées dans DMEM (1g/L glucose), 10% FCS, Gentamycine, Puromycine. Les Cos dans DMEM (1g/L glucose), 5% FCS, Gentamycine.

Test de réparation des 6-4PP :

Les cellules sontensemencées (5000 cellules/puit) sur plaque 96 puits (OptiPlates-96, Perkin Elmer). Le lendemain, elles sont irradiées aux UV-C (254nm) avec une dose de 10J/m^2 , et réincubées pendant différents temps à 37°C, 5%CO₂. Afin de marquer les lésions 6-4PP par IF, l'ADN est dénaturé dans 2M d'HCl pendant 30' à RT, puis les cellules sont incubées pendant 15' dans la solution de blocage (PBS + 10% BSA), avant le marquage avec l'Ac anti-6-4PP (clone 64M-2, Cosmo Bio). L'analyse a été faite avec le système INCell Analyser 1000 imaging system (GE Healthcare) qui a permis de déterminer le pourcentage de noyaux contenant des lésions 6-4PP, le 100% représentant la mesure faite au temps T₀ après irradiation UV.

Criblage siRNA :

Les cellules Hela sont transfectées sur plaque 96 puits par une banque de siRNA (INTERFERin®, Polyplus), 48h après elles sont irradiées avec une dose de 10J/M² d'UV-C, et remises en culture pendant 4 heures, puis un marquage par IF des lésions 6-4PP est réalisé comme décrit plus haut. L'analyse a été faite avec le système INCell Analyser 1000 imaging system (GE Healthcare) qui a permis de déterminer le pourcentage de noyaux contenant des lésions 6-4PP, le 100% représentant la mesure faite au temps T₀ après irradiation UV.

Test de survie aux UV :

Les cellules sont mises en culture sur plaque 6 puits (20000 cellules/puit), le lendemain elles sont irradiées à différentes doses d'UV-C (254nm), et remises en culture pendant 3 jours, ensuite elles sont colorées au Crystal violet, lysées et quantifiées par le spectrophotomètre à 570nm.

Pull down :

- Expression et purification des fragments : Des bactéries *E. coli* BL21 ont été transformées par 3 plasmides pGEX exprimant 3 fragments de la protéine ZBTB38 fusionnés à la GST (fig. 9A), l'expression a été induite par l'IPTG 0,5mM, et après 4 heures d'incubation à 25°C, puis centrifugation (5400rpm,10',4°), les bactéries ont été lysées (re-suspension dans 20 ml de PBS+PIC+Lysozyme, incubation 30' sur glace, 2 cycles de congélation/décongélation, puis 4 cycles de 30'' de sonication), et les surnageants contenant les extraits ont été récupérés après centrifugation (30000 rpm,45',4°), un gel coloré au bleu a permis de vérifier l'expression. Afin de purifier les protéines fusionnées à la GST, les extraits ont été incubés (2heures, 4°, sous agitation) avec 100µl de billes Glutathione Sepharose 4B® (GE Healthcare®), après centrifugation les billes ont été lavées 3x avec Tris HCl 50mM, Glycerol 10%, EDTA 0, 5mM, DTT 1mM (TG10ED)+ KCl 400mM, 0.05% NP40, et 3x avec TG10ED+ KCl 50mM, NP40 0.05%, puis incubées 1h à 4°, dans 300µl de solution d'éluion (20mM Tris HCl, 10mM glutathione). Un gel coloré au bleu a permis de vérifier la purification.

- Interaction avec TFIIH : 500ng de fragments ont été incubés avec 500ng d'extrait purifié de TFIIH, provenant du fractionnement d'un extrait total de cellules HeLa sur sept colonnes de chromatographie (Gerard et al., 1991) (5h à 4° sous agitation). Ensuite, une IP de TFIIH a été réalisée par incubation avec 2mg d'Ac anti-XPB, 20µl de billes couplées à la protéine A « GE Healthcare Protein A Sepharose® CL-4B », o/n à 4° sous agitation). Nous avons également réalisé l'IP soit sur l'extrait TFIIH seul ou sur les fragments seuls, comme contrôle. Les billes ont été lavées 3x avec du TG10ED+KCl 150mM puis une fois avec du TG10ED+KCl 150mM+NP-40 0.05%, puis incubées (5' à 95°) dans du T10E1+bleu de charge, les surnageants ont été analysés par WB, Gel 11%, anti-GST (IGBMC) de souris dilué au 1/5000°.

Co-immunoprécipitation :

Nous avons transfecté (kit jetPEI® Polyplus Transfection®) des cellules COS avec un plasmide exprimant TTDA-Flag et/ou un plasmide exprimant la partie fonctionnelle de ZBTB38 (Kaiso-like ZF) fusionnée à la GFP. Les cellules ont été récoltées après 48h d'incubation (37°, 5% CO₂). Des extraits nucléaires ont été préparés en utilisant le kit Nuclear Complex Co-IP® Active Motif®. Après vérification de la transfection par WB anti GFP (1/5000, TP-401, Torrey Pines®), des IP anti Flag ont été réalisées et les éluions ont été analysées par WB anti GFP.

Immunofluorescence :

- Mise en culture sur lame : 200,000 cellules par chambre sontensemencées 12h avant le marquage dans des lames *Lab-Tek II® Chamber Slide®*, avec 1ml de milieu de culture (Fibroblastes humains FB789, milieu : MEM, 15% FCS + AANE + Vit + Gentamycine + PS. Fibroblastes de patients TTD1BR et TTD1BR + TTDA-HA, milieu : MEM, 15% FCS, Gentamycine)

- Irradiation localisée : après lavage au PBS, un filtre millipore *Isopore®* (pores de 5µm) est délicatement déposé sur le tapis cellulaire humide, puis une irradiation aux UV-C (150J/m²) est réalisée avant l'addition de 1ml de milieu et l'incubation à 37° pendant le temps de réparation (5, 15, 30 ou 60').

- Marquages : Les cellules sont fixées au PFA 2%, 15' à RT, puis perméabilisée avec 0,5% Triton X-100, puis incubées pendant 45' à RT dans la solution de blocage (PBS

+ 10% FCS + 0,1% triton), et ensuite incubées avec l'Ac primaire pendant 2h à RT, et après 3 lavages au PBS + 0,1% triton, elles sont incubées avec l'Ac secondaire pendant 45' à RT, et lavées 3x au PBS+0,1% triton. Afin de réaliser le marquage des lésions CPD, les cellules, sont ensuite fixées au PFA, perméabilisées au Triton, et après dénaturation de l'ADN (HCL 2M, 20' à RT), elles sont soumises à blocage, incubation dans l'Ac anti-CPD, l'Ac secondaire, puis 4 lavages au PBS + Triton 0,2%, marquage des noyaux avec le DAPI, et montage (ProLong® Gold Antifade Reagent). Observation au microscope optique à fluorescence.

- Anticorps :

CPD	Mouse anti CPD, TDM2, Sigma	1/250
HA	Rat anti HA, Roche	1/1000
XPC	Mouse anti XPC, 2C11, IGBMC	1/3000
ZBTB38	Rabbit anti ZBTB38, clone 032, gift from P. A. Defossez	1/500
Ac Ilaire	Alexa fluor 488/546, anti mouse/anti rabbit	1/500

RESULTATS

Afin d'identifier de nouvelles interactions de la sous-unité TTDA de TFIIH, nous avons réalisé un crible double hybride (ULTimateY2H[®], Hybrigenics[®]), sur une banque de cDNA de placenta, l'appât étant TTDA. Nous avons obtenu une liste de protéines avec des scores d'interaction allant de A (très haute fiabilité) à F (faux positif). La particularité de ce test, est que pour chaque protéine de la banque, différents fragments chevauchants sont testés afin de déterminer le domaine d'interaction avec la protéine appât.

Parmi les positifs, nous avons sélectionné ZBTB38 (Zinc finger and BTB domain-containing protein 38), connue pour être recrutée au niveau des CpG méthylés et pour induire la répression des gènes portant ces méthylations. C'est une protéine de 134 Kd, elle comporte 10 ZF dont les trois centraux (kaiso-like ZF) sont responsables de la reconnaissance des CpGs méthylés de façon sequence-spécifique (Sasai et al., 2010), et c'est à cette partie de la protéine que correspond le SID (Small Interacting Domain) identifié par le crible double hybride réalisé sur TTDA.

1. ZBTB38 interagit avec TTDA

Le crible double hybride a permis de déterminer que les trois ZF Kaiso-like de ZBTB38 constituaient les sites d'interaction avec TTDA (fig. 9A). Afin de vérifier cela, nous avons d'abord réalisé un essai pull-down, dans lequel des extraits bactériens de trois fragments différents de ZBTB38 fusionnés à un tag GST (fig. 9A) ont été incubés avec un extrait purifié de TFIIH, et après une immuno-précipitation de XPB (sous-unité du TFIIH), la séparation sur gel a montré que seul le fragment comportant les Kaiso-like ZF était co-précipité avec le TFIIH (fig. 9B), contrairement aux deux autres qui correspondent respectivement au domaine BTB/POZ en N-terminal, et à la partie C-terminale de la protéine.

Après co-expression dans des cellules Cos d'un fragment comportant le domaine Kaiso-like ZF de ZBTB38 fusionné à la GFP, et de TTDA-Flag. La séparation sur gel après IP anti-Flag a montré la co-précipitation de ce fragment de ZBTB38 avec TTDA (fig. 9C).

Ces données démontrent donc que ZBTB38 interagit *in vitro* avec TTDA, par son domaine fonctionnel Kaiso-like ZF.

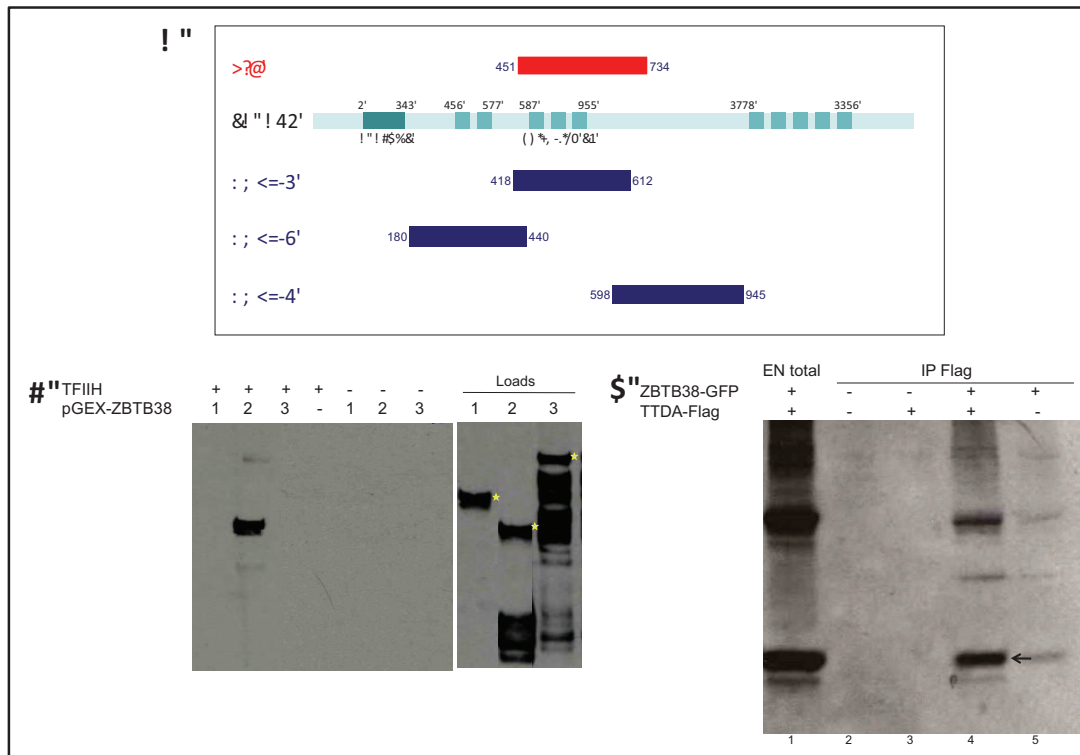


Figure 9 : ZBTB38 interagit avec TTDA par son domaine Kaiso-like ZF

A. schéma de la protéine ZBTB38, avec représentation du SID, et des fragments utilisés lors du GST pull down : SID: (selected interacting domain) domaine d'interaction défini par le criblé double hybride, correspond à la plus petite séquence commune entre plusieurs fragments de la même protéine qui ont interagit avec l'appât. pGEX-1 : Fragments comprenant le domaine BTB/POZ. pGEX-2 : Fragment de ZBTB38 comprenant le domaine fonctionnel Kaiso-like ZF. pGEX-3: Fragment de faible complexité en C-terminal. Ces fragments sont fusionnés à un tag GST. **B.** Pull-Down : interaction de TFIIH avec chacun des fragments de ZBTB38 mentionnés ci-dessus, IP anti-XPB, puis WB anti-GST. **C.** Co-IP : après co-transfection de TTDA-Flag et un fragment de ZBTB38 comportant le domaine kaiso-like ZF fusionné à la GFP, IP anti-Flag, WB anti-GFP. La flèche indique le fragment de ZBTB38.

2. ZBTB38 est nécessaire à l'activité NER

Nous avons sélectionné cette protéine en croisant les résultats du criblé double hybride avec ceux d'un criblage siRNA, réalisé dans une démarche d'identification de nouveaux facteurs de réparation NER, et qui consiste à marquer par IF les lésions 6-4PP résiduelles, après irradiation UV de cellules transfectées au préalable par une banque de siRNA. Nous avons obtenu une liste de protéines dont la sous-expression induit une baisse de l'activité NER. ZBTB38 sortait nettement du

bruit de fond avec un score de 48% de noyaux contenant encore des lésions 6-4PP, 3 heures après irradiation UV, contre 72% pour XPC, 86% pour XPB, deux protéines indispensable à la réparation NER et 20% pour le contrôle négatif (fig. 10), suggérant une implication de ZBTB38 dans la réparation NER.

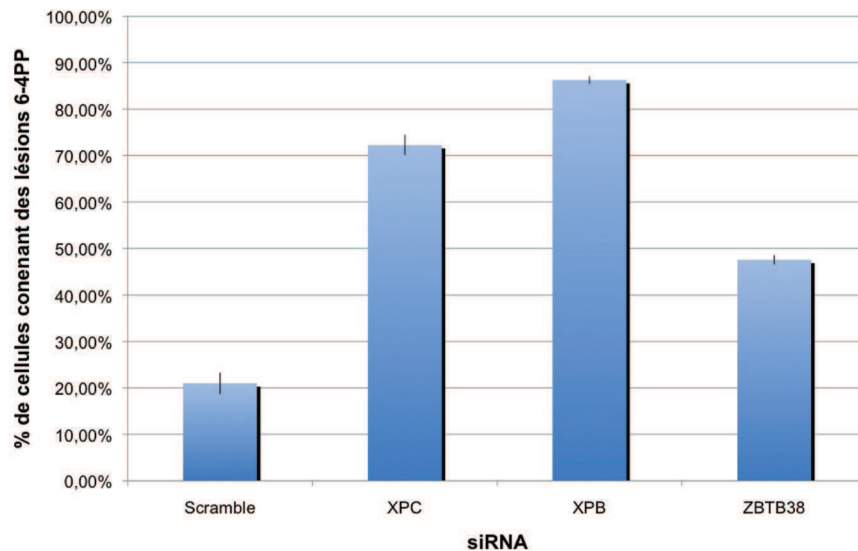


Figure 10 : Criblage siRNA/NER

Quantification par IF des cellules contenant des lésions 6-4PP, 4heures après irradiation aux UV. 100% correspond temps T_0 après irradiation.

Nous avons mis au point une lignée exprimant de façon stable un shRNA contre ZBTB38 (expression résiduelle de l'ARNm à 30%) , sur laquelle nous avons reproduit le test de réparation des lésions 6-4PP à différents temps après irradiation UV. Pour la lignée Hela shCtrl, 1 heure après irradiation il ne restait que 13% de cellules positives contre 81% pour la lignée shXPA, cette dernière n'a atteint les 10% de cellules positives qu'à la 6ème heure, traduisant le fort ralentissement de la réparation NER. La lignée shZBTB38 était à 29% à 1 heure, et a atteint un plateau d'environ 2% à la 4^{ème} heure, alors que la lignée shCtrl était à 3% à 2 heures pour atteindre un plateau de moins de 1% dès la 3ème heure (fig. 11A). Nous avons réalisé ensuite un test de survie aux irradiations UV sur ces lignées cellulaires, dans lequel la sous-expression de ZBTB38 a induit une augmentation significative de la sensibilité aux UVs (fig. 11B). Ces données ont permis de conclure que ZBTB38 est nécessaire à l'activité NER.

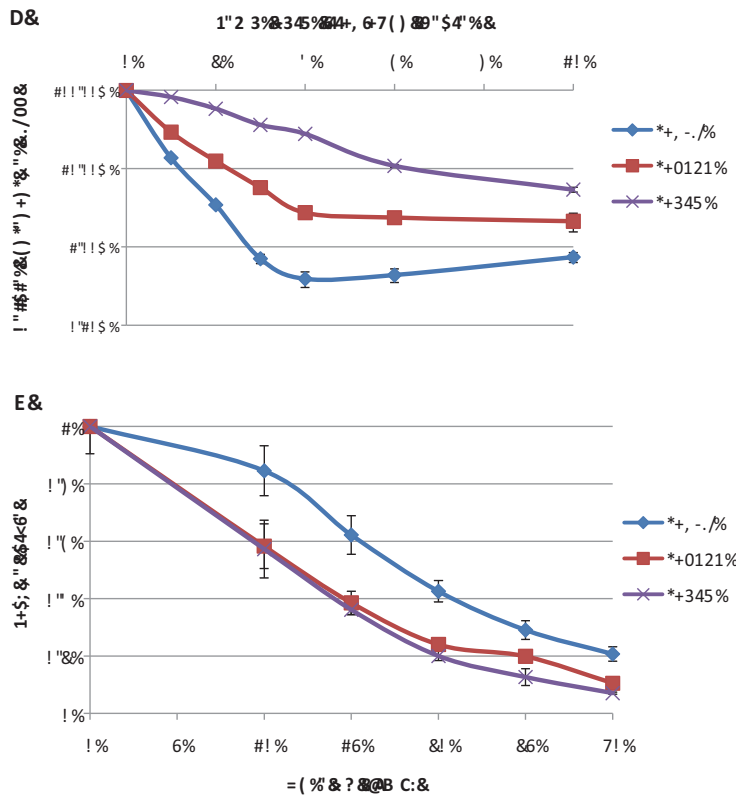


Figure 11 : la sous-expression de ZBTB38 perturbe l'activité NER.

A. test de réparation de lésion 6-4PP, cellules irradiées à $10\text{J}/\text{M}^2$, et après incubation aux temps indiqués, un marquage IF des 6-4PP a permis la quantification des noyaux positifs.

B. Test de survie aux UV, irradiation des cellules aux doses indiquées, incubation pendant 3 jours, coloration puis quantification des cellules. Les valeurs ont été rapportées à celles des points non irradiés.

3. ZBTB38 est recrutée sur les sites de réparation NER dépendamment de TTDA

Nous avons pu observer que ZBTB38 interagissait avec la sous-unité TTDA de TFIIH, et que sa sous-expression induisait une baisse de l'activité NER. Par la suite nous avons voulu vérifier si cette protéine était recrutée sur les sites de réparation NER. Ainsi par marquage IF après irradiation UV localisée sur des fibroblastes humains, nous avons observé le recrutement de ZBTB38 sur les spots de lésions CPD, le recrutement de XPC sur ces lésions indique l'activation de la réparation NER (fig. 12).

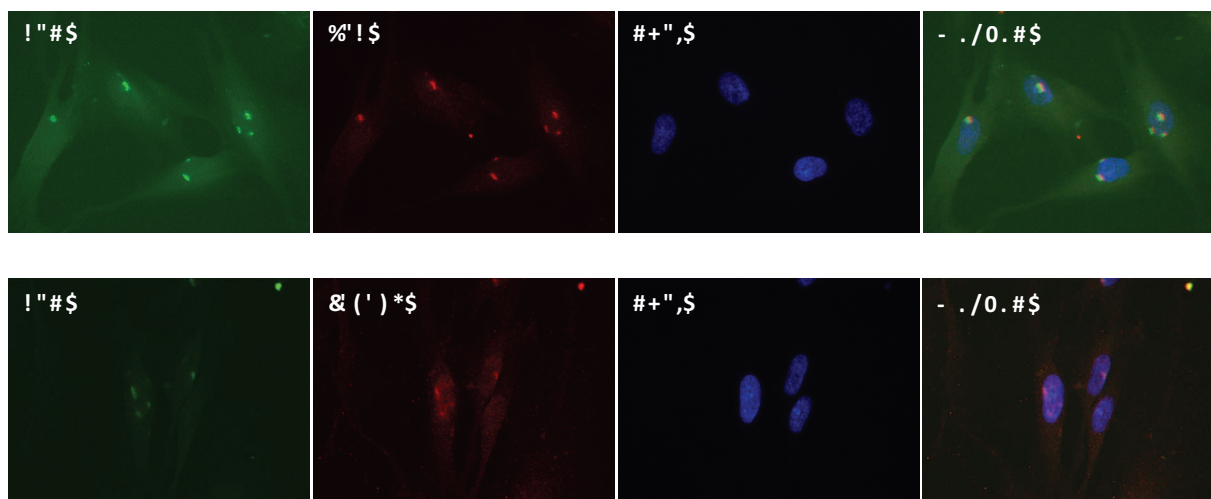
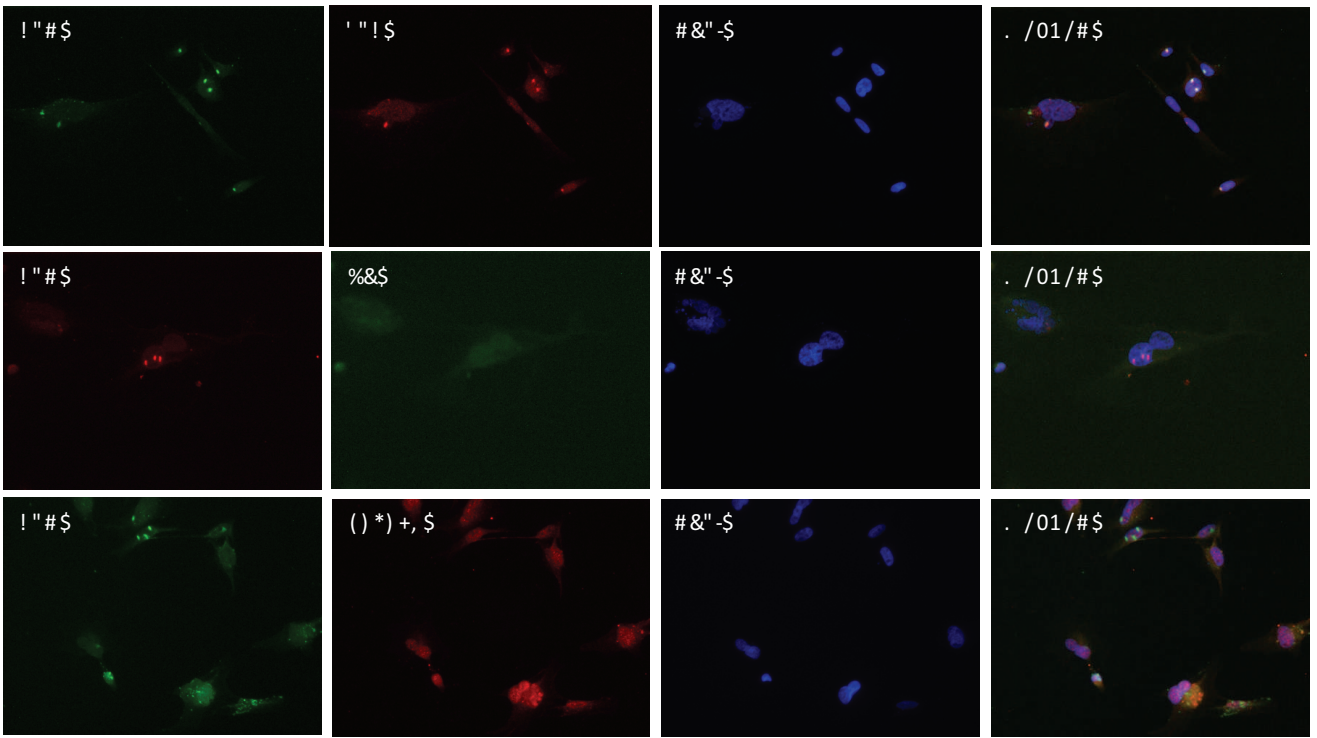


Figure 12 : ZBTB38 est recrutée sur les sites de réparation NER. IF sur fibroblastes FB789, co-marquage CPD/XPC et CPD/ZBTB38 après irradiation UV localisée 150J/m², 30' d'incubation.

Afin de vérifier le lien entre le recrutement de ZBTB38 au cours de la réparation NER et son interaction avec TTDA, nous avons effectué une série de marquages IF après irradiation UV localisée, sur des fibroblastes de patients TTD-A, caractérisés par l'absence d'une forme fonctionnelle de la sous-unité TTDA (patients TTD1BR), et restaurés ou non avec une forme recombinante TTDA-HA. Un marquage anti-HA a permis de vérifier le recrutement effectif de cette forme recombinante sur les spots de lésions CPD, dans les cellules restaurées. Le co-marquage de ZBTB38 a montré le recrutement de celui-ci sur les sites de réparation NER et uniquement dans la lignée exprimant TTDA-HA (fig. 13). Par une technique de vidéo imagerie *in vivo* sous microscope à fluorescence, nous avons également observé le recrutement du fragment comportant le domaine fonctionnel de ZBTB38 (Kaiso-like ZF) fusionné à la GFP sur le point d'irradiation localisée dans les cellules exprimant TTDA-HA, et pas dans les cellules non restaurées.

Ces données nous permettent de conclure que par son interaction avec TTDA, ZBTB38 est recrutée sur les sites de réparation NER.

!!"#\$%&



!!"#\$%&&!"()*(&

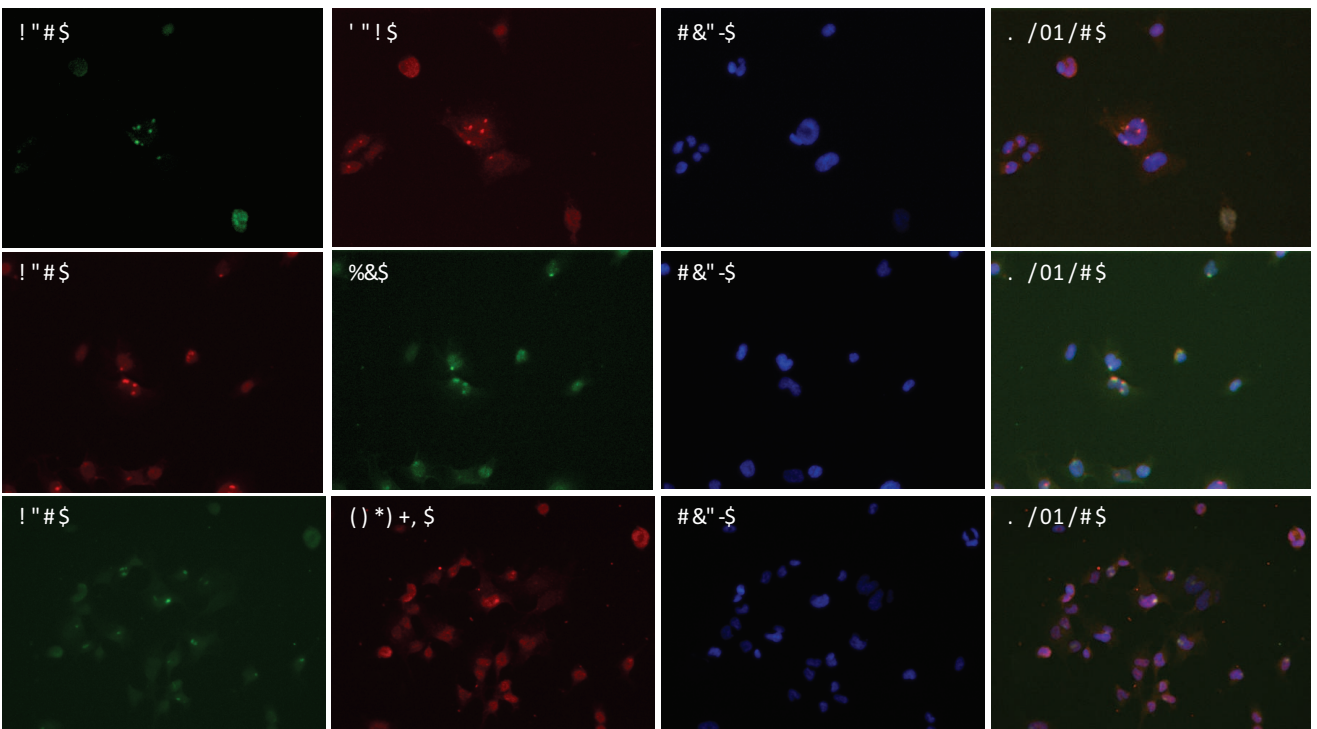


Figure 13 : le recrutement de ZBTB38 sur les sites NER dépend de TTDA
Co-marquages CPD/XPB, CPD/HA et CPD/ZBTB38 sur cellules TTD1BR et TTD1BR +
TTDA-HA. Irradiation UV localisée 150J/m², 30' d'incubation.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES:

1. L'apport du crible double hybride

Le crible double hybride réalisé sur TTDA a fourni une liste de protéines partenaires potentielles. Il nous semblait pertinent, afin d'affiner la sélection, de croiser les résultats avec ceux d'un criblage siRNA/NER réalisé dans le laboratoire sur une banque de siRNA dirigés contre des facteurs ayant un lien avec la chromatine. Cette comparaison nous a permis de sélectionner ZBTB38 (Zinc finger and BTB domain-containing protein 38), dont la répression réduit significativement l'activité NER et qui interagit avec TTDA au niveau des résidus 451-734, contenant des domaines en doigt de zinc (fig. 9A). ZBTB38 n'était pas positive dans un autre criblage siRNA sur la réparation des cassures double brin, indiquant la spécificité de son implication dans la réparation NER.

ZBTB38 est connue pour faire partie des MBP (Methyl-DNA Binding Protein), ce sont des protéines qui reconnaissent et se lient à l'ADN méthylé, elles ont un rôle dans l'organisation de la chromatine et le maintien de l'épigénome, elles interagissent avec d'autres facteurs épigénétiques. Elles sont réparties en trois familles : les protéines à MBD (Methyl-DNA Binding Domain) comprenant MBD1, MBD2, MBD4 et MeCP2, les protéines SRA (SET and RING associated domain) comprenant UHRF1 et 2, et la famille Kaiso-like (Fournier et al., 2011), comprenant comme chef de file Kaiso (appelée aussi ZBTB33). Kaiso possède un domaine BTB/POZ en N-terminal impliqué dans les interactions protéine-protéine, et trois doigts de zinc (ZF) en C-terminal qui permettent la liaison à l'ADN méthylé, mais aussi à une séquence consensus non méthylée KBS (Kaiso binding sequence), une recherche d'homologie avec ce domaine en doigts de zinc, a permis la mise en évidence de ZBTB4 et ZBTB38 (Filion et al., 2006).

ZBTB38 est une protéine de 134 Kd, elle comporte 10 ZF, dont les trois centraux (kaiso-like ZF) sont responsables de la reconnaissance des méthylations de l'ADN et de certaines séquences consensus non méthylées (Sasai et al., 2010), et sont nécessaires avec le domaine BTB/POZ présent en N-terminal à la répression méthyl-dépendante d'un gène rapporteur (Filion et al., 2006). Plusieurs études d'association pangénomique (GWA) ont identifié *ZBTB38* comme un des gènes liés à la stature (Clayton et al., 2013; Kim et al., 2012; Wang et al., 2013). Une étude

récente a aussi démontré l'implication de ZBTB38 dans la stabilité de l'ADN, *Miotto et al.* a identifié un axe RBBP6/ZBTB38/MCM10 impliqué dans la régulation de la réplication et la stabilité des sites fragiles communs (ou CFSs, régions particulièrement sensibles au stress réplicatif, et comportant plusieurs gènes répresseurs de tumeurs et oncogènes (Le Tallec et al., 2013)). Dans cet axe, RBBP6 est responsable de l'ubiquitination et donc la dégradation de ZBTB38, qui à son tour est responsable de la répression transcriptionnelle du facteur de réplication MCM10 (Miotto et al., 2014). Une autre étude a observé un lien entre les polymorphismes du gène *ZBTB38* et le risque de cancer de la prostate (Kote-Jarai et al., 2011).

Lors de l'expérience de pull down que nous avons réalisée, le domaine Kaiso-like ZF est le seul à avoir interagité avec TFIIH, contrairement aux fragments comportant le domaine BTB/POZ ou une partie centrale de faible complexité, confirmant le résultat du double hybride qui avait identifié un SID recouvrant le domaine Kaiso-like ZF. Cette interaction a également été confirmée par IP après co-expression de ce domaine de ZBTB38 fusionné à la GFP avec TTDA-Flag.

2. ZBTB38 et TTDA

ZBTB38 a également été trouvé dans un criblage de siRNA à la recherche de gènes ayant un lien avec la NER. Après avoir montré que ZBTB38 interagissait avec TTDA et qu'elle est impliquée dans la réparation NER, nous avons voulu vérifier son recrutement sur les sites de réparation NER. Le marquage par immunofluorescence sur des fibroblastes humains WT après irradiation UV localisée, nous a permis de visualiser le co-recrutement de ZBTB38 avec les facteurs NER (XPC, TFIIH) sur les spots de lésions CPD.

Afin de vérifier si ce recrutement nécessite l'interaction avec TTDA, nous avons réalisé ces marquages sur des cellules de patients TTD-A restaurées avec TTD-HA, dans lesquelles nous avons observé une co-localisation de ZBTB38, TTDA-HA et XPC avec les lésions CPD sur les spots d'irradiation aux UV, indiquant le co-recrutement de ZBTB38 avec TFIIH et les autres facteurs NER sur les sites de réparation. L'absence de forme fonctionnelle de TTDA entrave le recrutement de ZBTB38 dans les cellules non restaurées, alors que le système NER est bien engagé comme le montre le recrutement de XPC. Nous en déduisons que le recrutement de

ZBTB38 *in vivo* au cours du NER, nécessite la présence d'une forme fonctionnelle de TTDA.

L'ensemble de ces résultats nous montre qu'en plus d'être requise pour la réparation des lésions CPD induites par les UV, ZBTB38 interagit avec TFIIH et plus particulièrement la sous unité TTDA par son domaine Kaiso-like ZF, impliqué dans la reconnaissance des méthylations CpG de l'ADN. ZBTB38 est spécifiquement recrutée lors de la réparation des lésions UV par NER, et ce recrutement a lieu après celui du complexe TFIIH et nécessite la présence d'une forme fonctionnelle de TTDA.

Nous émettons l'hypothèse que ZBTB38 est recrutée sur les sites de réparation NER afin qu'elle soit concentrée à proximité de l'ADN néosynthétisé par le système. Ce double recrutement de ZBTB38 (par TTDA et les CpG méthylés) favoriserait la répression de la transcription pendant la réparation des lésions UV-induites ; il nous semble donc intéressant d'étudier l'état de méthylation de l'ADN après NER en réalisant une irradiation UV localisée suivie d'un immuno-fluoromarquage des CpG méthylés avant et après réparation, et le co-marquage de ZBTB38 afin de visualiser son recrutement. Un ChIP sur des cellules irradiées aux UV avec différents temps d'incubation suivi d'une analyse par Western blot (Coin et al., 2008) des protéines immunoprécipitées sera également réalisé dans le but de quantifier cette hyperméthylation en utilisant des Ac spécifiques aux méthylations CpG, et des Ac spécifiques à ZBTB38. La réalisation de ces expériences sur des cellules de patients TTD-A restaurées ou non, permettra d'évaluer le rôle de l'interaction avec TTDA. Enfin, à la vue des résultats récents obtenus sur ZBTB38 (papier defoosez cell reports), il est possible que le recrutement de ZBTB38 ait un lien avec la signalisation lié à la présence aux dommages. Nous allons donc entamer une étude des signaux de réponse aux dommages (phosphorylation Chk1 et ATR, étude du cycle cellulaire) dans des lignées où l'expression de ZBTB38 aura été éteinte.

**Partie II : Etude du recrutement des facteurs
NER sur la chromatine en absence de
dommages de l'ADN.**

Résultats

Publication : Molecular insights into the formation of the nucleotide excision repair complex revealed on undamaged chromatin.

Publication soumise à *Journal of Cell Biology*, en cours de révision.

**Molecular Insights into the formation of the nucleotide excision repair complex
revealed on undamaged chromatin**

**Salim Ziani^{1,3}, Zita Nagy^{1,3}, Sergey Alekseev¹, Evi Soutoglou², Jean-Marc Egly¹ and
Frédéric Coin^{1,4}**

¹IGBMC, Department of Functional Genomics and Cancer, Equipe Labellisée Ligue 2014.
CNRS/INSERM/Université de Strasbourg, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, C. U. Strasbourg,
France.

²IGBMC, Department of Development Biology and Stem Cells. CNRS/INSERM/Université de
Strasbourg, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, C. U. Strasbourg, France.

³These authors contributed equally to this work

⁴Corresponding author

Tel: +33 3 88 65 34 49

Characters: 19841

Key words: XPC, TFIIH, XPF, Nucleotide Excision Repair

Short Title: Pre-incision complex formation on undamaged chromatin

Abstract

In nucleotide excision repair (NER), DNA damage recognition by XPC-hHR23b is described as a critical step in the pre-incision complex (PInC) formation further composed of TFIIH, XPA, RPA, XPG and ERCC1-XPF. Recent findings indicate that NER factors also participate to fundamental cell processes taking place in the absence of damage, which questions the molecular mechanisms governing PInC formation in NER. Using the lactose operator/repressor system (LacO-LacR), we observe a sequential and ordered self-assembly of the PInC operating upon immobilization of individual NER factors on undamaged chromatin and mimicking that functioning on a DNA damage. Using this system, we reveal molecular insights into NER. Among others, we show that the recruitment of the TFIIH subunit TTDA, involved in Trichothiodystrophy group A disorder (TTD-A), is key in the PInC completion as it recruits XPA through a protein domain depleted in TTD-A patients. These results suggest that immobilization of NER factors on chromatin is sufficient to trigger PInC formation through protein-protein interactions, independently of DNA damage.

Introduction

One of the most versatile mammalian DNA repair pathways is nucleotide excision repair (NER) in which repair factors assemble sequentially on a DNA lesion. Firstly, the heterodimer XPC-hHR23b locates DNA injuries in a critical step that initiates the formation of the pre-incision complex (PInC). Subsequently, XPC-hHR23b recruits the transcription/repair factor TFIIH (Sugasawa et al., 1998) containing ten subunits (XPB, XPD, p62, p52, p44, p34, cdk7, cyclH, MAT1 and TTDA) (Compe and Egly, 2012) that are not always strictly part of the complex (Zhovmer et al., 2010). For instance, TTDA can also be found as a free fraction that associates with TFIIH only after induction of NER-specific DNA lesions (Giglia-Mari et al., 2006). Loading of TFIIH promotes unwinding of the damaged DNA thereby providing a three-dimensional structure able to recruit XPA and RPA (Oksenych et al., 2009). The edges of the DNA bubble created by the TFIIH helicases are recognized by XPG and ERCC1-XPF, two junction-specific endonucleases with opposite single-strand polarities. Altogether, XPC, TFIIH, XPA, RPA, XPG and ERCC1-XPF form the pre-incision complex (PInC) that will generate 3' and 5' single DNA incisions relative to the damage (O'Donovan et al., 1994; Sijbers et al., 1996), preceding the excision of a 24-32mer damaged oligonucleotide and gap-filling DNA resynthesis (Ogi et al., 2010). Although XPC has a high affinity for several NER substrates such as the UV light induced pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts, its binding to some of them can be weak and require XPE, composed of the damaged DNA-binding proteins 1 and 2 (DDB1 and 2) (Tang et al., 2000). Mutations in genes coding for XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG and TTDA give rise to xeroderma pigmentosum (XP), trichothiodystrophy (TTD) or a combined XP and Cockayne syndrome (XP/CS). These inherited human disorders exhibit a broad spectrum of clinical features including photosensitivity of the skin due to defect in NER (Lehmann, 2003).

Earlier studies have shown an additional role for NER factors in the transcription of class I and II genes (Barreto et al., 2007; Fong et al., 2011; Kamileri et al., 2012; Le May et al., 2010; Schmitz et al., 2009). Upon transactivation, XPC, XPA, XPG or XPF, together with TFIIH, assemble onto promoters occupied by the transcription machinery to trigger gene

expression (Fong et al., 2013). Similarly to what happens in NER, the absence of XPC leads to a deficient recruitment of TFIIH, XPG, XPA or XPF to the promoter of activated genes (Le May et al., 2010).

In the current model of NER, PInC formation depends on the recognition of the DNA lesion by XPC-hHR23b that will then recruit downstream factors (Sugasawa et al., 1998). However, the participation of NER factors in other cellular processes, such as transcription, which do not involve DNA lesions, raised the question of the importance of these lesions in the PInC formation.

To obtain molecular insights into the assembly of the NER factors, we analyzed PInC formation independently of the presence of DNA damage. For that purpose, we used the lac operator/lac repressor (LacO/LacR) reporter system allowing stable targeting of individual NER factors to a defined chromosomal locus *in vivo* (Soutoglou and Misteli, 2008; Tumber et al., 1999). We demonstrated that a sequential and ordered self-assembly of NER factors operates upon prolonged immobilization of individual factors on undamaged chromatin. While immobilisation of either DDB2 or XPC led to the formation of an abortive PInC, tethering subunits of TFIIH (XPB or TTDA) allowed its completion. Our reporter system also allowed us to determine first, that the N-terminal (N-ter) region of XPC loaded TFIIH to chromatin and second, that the presence of TTDA in the PInC was crucial for the recruitment of XPA through a direct interaction that required the N-ter region of TTDA, depleted in some TTD-A patients. The physiological meanings of these findings were analysed in NER and proved that the LacO-LacR system can be used to decipher the molecular details of a complex cellular reaction in a normal or pathological situation *in vivo*.

Results and Discussion

Prolonged immobilization of XPC on chromatin leads to abortive PlnC formation

To obtain molecular insights into the formation of the PlnC in the absence of DNA damage, we used the LacO/LacR reporter system (Soutoglou and Misteli, 2008; Tumber et al., 1999). We fused the full-length human GFP-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ construct (Bernardes de Jesus et al., 2008) with the LacR (Figure 1A). In a local UV irradiation experiment (Coin et al., 2006), GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ colocalized with XPB on UV-C induced DNA damage (Figure S1A, B), showing its functionality.

Expression of GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ in U2OS17 cells (Figure 1B), containing an array of 256 copies of the LacO sequence (Soutoglou and Misteli, 2008), resulted in the efficient localization of the fusion protein to discrete areas of the nucleus, characteristic of the LacO loci (Figures 1C, D, E and F, panels d). In contrast, GFP-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾, lacking the LacR, was not recruited to the array in U2OS17 (Figure S1F), indicating that the lacO locus did not contain DNA damage or structural alterations recognized by XPC. In GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾-expressed U2OS17 cells, we observed a co-localisation of GFP with hHR23b (Figures 1C, panels e-f and 1G) and with the subunits of TFIIH, XPB (Figure 1D, panels e-f and 1D) and p44 (Figure S2) that was not observed following expression of GFP-LacR (Figure 1C and 1D, panels b-c and 1G and H). In marked contrast to XPB or p44, the NER-specific TFIIH subunit TTDA and the TFIIH-downstream NER factor XPA were not, or barely, recruited to immobilized GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ (Figures 1E and 1F, panels e-f and 1I and J). These results show that sequestration of XPC to undamaged chromatin leads to the formation of an abortive PlnC containing XPC, hHR23b and TFIIH, with the exception of TTDA.

Domains of XPC required for hHR23b and TFIIH interactions

The interaction regions of XPC with TFIIH and hHR23b have been assigned to its C-terminal (C-ter) part using biochemical experiments (Uchida et al., 2002). We applied our reporter system to delineate the interacting domains of XPC with hHR23b and TFIIH on the chromatin. We first generated the mutant protein GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁵⁷⁹⁾, deleted in the C-ter

end (Figures 2A and 2B). Surprisingly, while tethering of GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁵⁷⁹⁾ to chromatin led to a loss of hHR23b recruitment to the array, it promoted the loading of XPB or p44 (Figures 2C and D, panels d-f and Figure S2). Similarly, a larger deletion of the C-ter of XPC generating the GFP-LacR-XPC⁽¹⁻²⁰⁰⁾ protein (Figure 2A), was still efficient in recruiting XPB or p44 (Figure 2D, panels g-l and Figure S2). Finally, we deleted the N-ter region of XPC to generate the GFP-LacR-XPC⁽²⁰⁰⁻⁹⁴⁰⁾ mutant (Figure 2A) that did not elicit the recruitment of XPB or p44, while it was able to attract hHR23b (Figures 2C and D, panels j-l and Figure S2). To reveal the biological significance of these observations in NER, we performed local UV-irradiation in XP-C cells transfected either with GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ or GFP-lacR-XPC⁽²⁰⁰⁻⁹⁴⁰⁾ constructs and showed that both proteins were recruited to UV-damaged areas labelled by anti-cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) (Figure 2E, panels a,c and d,f). In contrast, XPB was locally recruited to CPD in GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ but not in GFP-LacR-XPC⁽²⁰⁰⁻⁹⁴⁰⁾ transfected cells (Figure 2E, panels b and e). These data indicate that the N-ter region of XPC recruit TFIIH to damaged sites.

Tethering of XPB and DDB2 reveals ordered assembly of PlnC to undamaged chromatin

We subsequently tested whether the PlnC was able to form on the LacO array upon tethering of TFIIH. For that purpose we first integrated the LacR into the full-length human XPB⁽¹⁻⁷⁸²⁾-GFP construct (Figure 3A) (Oksenysh et al., 2009). We performed Immunoprecipitation experiments using an antibody against p62, another TFIIH subunit and observed a similar incorporation of XPB⁽¹⁻⁷⁸²⁾-GFP and XPB⁽¹⁻⁷⁸²⁾-LacR-GFP proteins into the TFIIH complex (Figure 3B). Furthermore, we observed co-localization of XPB⁽¹⁻⁷⁸²⁾-LacR-GFP with XPC in local UV-irradiation experiment, showing its functionality (Figure S1C).

Expression of XPB⁽¹⁻⁷⁸²⁾-LacR-GFP in U2OS17 cells led to its stable binding to the LacO array (Figures 3C-G, panel a) but did not result in the recruitment of XPC (Figure 3C, panel b) or hHR23b (Figure 3D, panel b), two TFIIH-upstream NER factors. In contrast, two TFIIH subunits, TTDA (Figure 3E) and p44 (Figure S2), and two TFIIH-downstream NER factors,

XPA (Figure 3F) and XPF (Figure 3G), clearly colocalized with GFP on the array in the presence of XPB⁽¹⁻⁷⁸²⁾-LacR-GFP, compared with LacR-GFP.

These data suggest that tethering an individual NER factor to the LacO locus leads to the recruitment of the immediate downstream factors but not of those upstream. To extend this observation, we introduced the LacR cassette into the YFP-DDB2⁽¹⁻⁴²⁷⁾ construct (Alekseev et al., 2008) (Figure 4A). The YFP-LacR-DDB2⁽¹⁻⁴²⁷⁾ functionality was shown in locally irradiated cells (Figure S1D). As previously observed, tethering DDB2 to chromatin in U2OS17 cells caused an unfolding of the array visualized by larger spots, characteristic of decondensed chromatin (Luijsterburg et al., 2012). In agreement with our hypothesis, tethered YFP-LacR-DDB2 recruited XPC (Figure 4B) but not XPB and XPA (Figures 4C-D) to the LacO array. Altogether these results demonstrate that PlnC formation on undamaged chromatin is ordered.

Recruitment of TTDA to chromatin is key in PlnC assembly

The above data also point to a crucial role of TTDA in the completion of the PlnC. Its presence in TFIIH on the LacO array correlates with the recruitment of XPA and XPF (see Figure 1 and 3). To study this hypothesis, we constructed the TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾-LacR-GFP fusion protein (Figures 5A-B) that co-localized with XPC on local UV-induced DNA damage (Figure S1E). Prolonged immobilization of TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾-LacR-GFP in U2OS17 cells induced the recruitment of XPB, XPA and XPF (not shown) but not that of XPC and hHR23b (Figure 5C-E).

Some TTD-A patients carry a mutation in the start codon of *TTDA* (Giglia-Mari et al., 2004). However, a downstream start codon at position 16 can be used and produce a truncated polypeptide lacking the first 15 aa (Giglia-Mari et al., 2004). Tethering TTDA⁽¹⁵⁻⁷¹⁾-LacR-GFP to chromatin decreased the recruitment efficiency of the TFIIH subunit XPB as well as the downstream-NER factor XPA (Figure 5C-E), indicating that the N-ter region of TTDA is directly involved in protein-protein interactions required for PlnC completion. TTDA interacts with XPD and p52 in TFIIH (Coin et al., 2006). Each of these core TFIIH proteins

was expressed in *E. coli* and tested for their interaction with recombinant and purified flag-TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾ or flag-TTDA⁽¹⁵⁻⁷¹⁾ proteins. XPD and p52 were pulled down with both the wild type or the mutant TTDA (Figure 5F, lanes 1-4). In contrast, the immediate TFIIH-downstream NER factor XPA interacted only with flag-TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾ but not with flag-TTDA⁽¹⁵⁻⁷¹⁾. In an *in vitro* dual incision assay (Coin et al., 2006), deletion of the first 15 aa of TTDA strongly decreased the repair function of TTDA (Figure 5G). We also analyzed the recruitment of XPA by pre-incubating (Preinc) an immobilized biotinylated mono-damaged DNA (Riedl et al., 2003) with XPC/hHR23B, IIH9 (recombinant TFIIH without TTDA) and XPA, with either flag-TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾ or flag-TTDA⁽¹⁵⁻⁷¹⁾. The immobilized mono-damaged DNA was subsequently washed to remove the non-specifically bound proteins and re-incubated with XPC-hHR23b, purified TFIIH from HeLa, RPA, XPG and ERCC1-XPF without XPA, in a dual incision assay. Dual incision activity was observed when flag-TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾ was present in the Preinc (Figure 5H, lane 2), indicating that XPA was retained in the Preinc. In contrast, deletion of the first 15 aa of TTDA impaired the recruitment of XPA to DNA damage and subsequently dual incision (Figure 5H, lane 1). These results suggest that XPA is recruited to DNA damage through the N-ter of TTDA, which is deleted in some TTD-A patients.

In conclusion, we show here that PInC formation on undamaged DNA occurs by a sequential and ordered assembly of NER factors that fully mimics that of the NER reaction on damaged DNA (Riedl et al., 2003; Volker et al., 2001). In our artificial system, XPC can bind to tethered DDB2 but not to tethered XPB. On the opposite, tethering of XPC led to an efficient recruitment of XPB to the array. XPB didn't recruit XPC but it attracted the downstream factors XPA or XPF to the chromatin (Figure S3A). Presumably, the absence of recruitment of XPC to XPB is caused by steric constraints due to the presence of XPA that may display higher affinity for TFIIH than XPC. Such mechanism may also occur during classical NER since the recruitment of XPA required the exclusion of XPC from the PInC, suggesting that a complex composed of XPC, TFIIH and XPA cannot exist on chromatin (Riedl et al., 2003).

The rules regulating the formation of the PInC on the LacO locus are clearly different from what has been observed so far with the LacO/LacR system. Indeed, it was previously observed that tethering components of large complexes such as those of the Cajal body led to the self-organisation of a full complex independently of any order of assembly, described as molecular crowding (Kaiser et al., 2008). Also, in the case of DNA damage response (DDR), tethering MDC1 led to the recruitment of the upstream factors NBS1 and MRE11 (Soutoglou and Misteli, 2008), a situation that did not occur with the NER proteins.

Our work also reports that the association of the NER factors with the LacO array is precisely regulated. Abortive PInC was generated following the tethering of XPC to the LacO site, while PInC was able to form when XPB was immobilized on chromatin (Figure S3A). In that case, XPA and XPF were both recruited to the array. Based on these results the question of which factors play a role in the regulation of the sequence of events during PInC formation was raised. While the TFIIH subunits, XPB and p44, were recruited to immobilized XPC, the repair-specific TFIIH subunit TTDA was not. In contrast, when XPB was tethered, TTDA was present on the array (Figure S3A). In agreement with a crucial role for TTDA in the formation of PInC, tethering of TTDA to the array also led to the recruitment of XPB, p44, XPA and XPF. Moreover, deletion of the first 15 aa of TTDA, as found in TTD-A patients, impaired the recruitment of the TFIIH-downstream factor XPA to the LacO *in vivo* as well as to DNA damage *in vitro*. In agreement with these data, we showed that TTDA directly interacted with XPA through its N-ter domain, thereby explaining the NER defect harbored by patients bearing a mutation deleting the first 15 aa of TTDA. These results provided evidence that data obtained with the LacO-LacR reporter system could be used to understand the molecular defects of a genuine system such as NER in a pathological situation. The fact that PInC formation was aborted when TTDA was absent may also suggest that *bona fide* NER substrates elicit the recruitment of TTDA to the XPC-TFIIH complex in order to complete the formation of the PInC in a classical NER reaction (Giglia-Mari et al., 2006).

The LacO/LacR system revealed additional structural details of the assembly of the PInC. TFIIH and hHR23b are two known partners of XPC (Sugasawa, 2008), described to interact

with the C-ter half of XPC (Bunick et al., 2006; Uchida et al., 2002). Interestingly, we found that while hHR23b indeed interacted with the C-ter half region of XPC on chromatin, the TFIIH-interacting domain of XPC was assigned to the first 200 aa (Figure S3B). In parallel, we observed that deletion of the first 200 aa of XPC hindered the recruitment of XPB to local UV-irradiation patches and consequently DNA repair, strengthened the observation made with the LacO/LacR system.

Materials and Methods

Cell lines and transfection. U2OS, U2OS17 (containing sequences of 256x repetitions of LacO) (Soutoglou and Misteli, 2008) and GM14867 (XP-C cells) (Bernardes de Jesus et al., 2008) cell lines were cultured in DMEM (4,5 g/l Glucose) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

Plasmids. To generate fusions between LacR, repair factors and GFP/YFP tag, cDNA of LacR was amplified by PCR and cloned in plasmids containing XPC, XPB, TTDA or DDB2 cDNA described elsewhere (Alekseev et al., 2008; Bernardes de Jesus et al., 2008; Coin et al., 2006; Oksenyich et al., 2009). For truncated forms of XPC and TTDA, site-directed mutagenesis was performed on GFP-LacR-XPC and TTDA-LacR-GFP plasmids using QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). RFP-tagged TTDA, Flag-tagged XPA and HA-tagged XPF were described elsewhere (Giglia-Mari et al., 2004; Su et al., 2012; Unsal-Kacmaz et al., 2007). For transfection, cells were cultured on coverslips, transfected using the FuGENE6 transfection reagent (Promega) with the appropriate DNA plasmids, and proteins were visualized 16-24 hours after transfection by immunofluorescence.

Immunofluorescence in the LacR/LacO reporter system. Sixteen to twenty-four hours after transfection with the appropriate plasmid DNA, cells were fixed with 2% PFA in PBS (10 minutes at RT), then permeabilised with 0,5% Triton X-100 (5min at RT). For XPC, XPB and p44 staining, cells were incubated for 40s with ice-cold Nuclear Pre-extraction buffer (50mM HEPES pH7, 150mM NaCl, 10mM EGTA, 2mM MgCl₂ and 0.5% Triton X-100) prior to fixation. After incubation in blocking buffer (PBS + 10% FCS + 0,2% Triton), cells were stained with the appropriate primary antibody diluted in Blocking buffer (2 hours at RT), washed 3 times, then stained with Alexa fluor (546) secondary (Invitrogen) Ab (45 minutes at RT). After 4 washes with PBS+ 0,2% Triton and staining with DAPI, cells were mounted with ProLong

Gold antifade reagent (Molecular Probes), and observed with Leica SP2-UV confocal microscope. Z-stack width was set to 0,5 μ M.

Cell extract and Western blot. Twenty-four hours after transfection, cells were scraped in PBS, lysed in RIPA buffer 10mM Tris-Cl (pH 8.0), 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 140mM NaCl and centrifuged at 10Krpm for 20min at 4°C. For loading control, fifteen μ g of each extract was loaded on an SDS PAGE gel. For IP, 300 μ g of each extract was incubated overnight with rabbit anti-p62 antibody and Dynabeads proteinG (life Technologies), after 3 washes the beads were heated to 95°C in loading buffer, and loaded on an SDS PAGE gel, the membrane was blotted with anti-XPB antibody.

Local UV-irradiation. Twenty-four hours after transfection, cells were irradiated with UV-C at 150J/m² dose through an isopore polycarbonate filter with pores of 5 μ m diameter (Millipore). Fifteen minutes later cells were fixed with PFA and proceeded for immunofluorescence staining with primary antibodies as indicated. After incubation with the corresponding secondary antibodies (Alexa fluor (546) or Alexa fluor (488) secondary Ab (Invitrogen)), cells were fixed and DNA denatured with 2M HCl. UV-lesions were marked with an anti-CPD antibody followed by Alexa fluor (647) secondary (Invitrogen) Ab.

Pull-down assay. Flag-TTDA polypeptides were expressed in *E.Coli* and incubated with anti-flag covered beads in RIPA buffer. XPD, p52 and XPA were expressed in *E.Coli* and cell lysates were incubated at 4°C for 1 hour in RIPA buffer, with 500ng of washed flag-TTDA proteins bound to beads. Pull downs were washed with RIPA and analyzed by western blotting.

NER assay. Dual incision assay was carried out in 25 μ l of incision buffer 50mM HEPES–

KOH pH 7.6, 20mM Tris-HCl pH 7.6, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 0.5mM EDTA, 10% glycerol supplemented with 2mM ATP. Each reaction contained 100ng of recombinant TFIIH factor containing nine subunits and lacking TTDA (IIH9) (Coin et al., 2006), 5ng of XPG, 15ng of XPF/ERCC1, 10ng of XPC-hHR23B, 50ng of RPA and 25ng of XPA. Following 10 minutes pre-incubation at 30 °C, 30ng of Pt DNA was added and the reaction was continued for 90 minutes at 30°C. The excised fragment was detected on 14 % urea-acrylamide after annealing with 9ng of the complementary oligonucleotide and addition of four radiolabeled dCMP α -P32 (3000 μ Ci/mmol) residues by Sequenase V2.1 (USB).

XPA binding study on immobilized DNA. Damaged DNA labeled with biotine was prepared as described (Riedl et al., 2003). M-280 Streptavidin dynabeads (Dyna) were coupled to damaged DNA according to manufacturer instructions and were subsequently incubated in 10mM HEPES, 100mM Glutamate, 10mM MgOAc, 5mM EGTA, 3,5%glycerol, 60mg/ml casein, 5 mg/ml PVP and 2.5mM DTT 15 min at room temperature to limit unspecific binding of proteins. Immobilized DNA was then incubated with 100 ng of recombinant XPC-hR23B, 50 ng of XPA, 100 ng of IIH9 and 5ng of either Flag-TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾ or Flag-TTDA⁽¹⁵⁻⁷¹⁾ at 30°C, 15 min with 2mM ATP. After incubation, magnetic beads were collected on a magnetic particle concentrator (Dyna MPC) and supernatants removed. Beads were then washed 5 times in 4 vol. of cold incision buffer and re-suspended in the same buffer for functional analysis of bound XPA in a subsequent dual incision assay containing all the NER factors except XPA (Riedl et al., 2003).

Author's contribution: SZ, ZN and FC performed the experiments. ES and JME provided cell line and antibodies. FC and ZN designed the experiments, analyzed the data and wrote the paper.

Acknowledgements: We thank Leon Mullenders for the DDB2-GFP construct and Sergey Alekseev and Annabel Larnicol for technical help. This study was supported by the ANR and the Ligue Contre le Cancer.

References

- Alekseev, S., M.S. Luijsterburg, A. Pines, B. Geverts, P.O. Mari, G. Giglia-Mari, H. Lans, A.B. Houtsmuller, L.H. Mullenders, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 2008. Cellular concentrations of DDB2 regulate dynamic binding of DDB1 at UV-induced DNA damage. *Molecular and cellular biology*. 28:7402-7413.
- Barreto, G., A. Schafer, J. Marhold, D. Stach, S.K. Swaminathan, V. Handa, G. Doderlein, N. Maltry, W. Wu, F. Lyko, and C. Niehrs. 2007. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*. 445:671-675.
- Bernardes de Jesus, B.M., M. Bjoras, F. Coin, and J.M. Egly. 2008. Dissection of the Molecular Defects Caused by Pathogenic Mutations in the DNA Repair Factor XPC. *Molecular and cellular biology*. 28:7225-7235.
- Bunick, C.G., M.R. Miller, B.E. Fuller, E. Fanning, and W.J. Chazin. 2006. Biochemical and structural domain analysis of xeroderma pigmentosum complementation group C protein. *Biochemistry*. 45:14965-14979.
- Coin, F., L.P. De Santis, T. Nardo, O. Zlobinskaya, M. Stefanini, and J.M. Egly. 2006. p8/TTD-A as a Repair-Specific TFIIH Subunit. *Mol Cell*. 21:215-226.
- Compe, E., and J.M. Egly. 2012. TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13:343-354.
- Fong, Y.W., C. Cattoglio, and R. Tjian. 2013. The intertwined roles of transcription and repair proteins. *Mol Cell*. 52:291-302.
- Fong, Y.W., C. Inouye, T. Yamaguchi, C. Cattoglio, I. Grubisic, and R. Tjian. 2011. A DNA repair complex functions as an oct4/sox2 coactivator in embryonic stem cells. *Cell*. 147:120-131.
- Giglia-Mari, G., F. Coin, J.A. Ranish, D. Hoogstraten, A. Theil, N. Wijgers, N.G. Jaspers, A. Raams, M. Argentini, P.J. van der Spek, E. Botta, M. Stefanini, J.M. Egly, R. Aebersold, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 2004. A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet*. 36:714-719.
- Giglia-Mari, G., C. Miquel, A.F. Theil, P.O. Mari, D. Hoogstraten, J.M. Ng, C. Dinant, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 2006. Dynamic Interaction of TTDA with TFIIH Is Stabilized by Nucleotide Excision Repair in Living Cells. *PLoS Biol*. 4:e156.
- Kaiser, T.E., R.V. Intine, and M. Dundr. 2008. De novo formation of a subnuclear body. *Science*. 322:1713-1717.
- Kamileri, I., I. Karakasilioti, A. Sideri, T. Kosteas, A. Tatarakis, I. Talianidis, and G.A. Garinis. 2012. Defective transcription initiation causes postnatal growth failure in a mouse model of nucleotide excision repair (NER) progeria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:2995-3000.
- Le May, N., D. Mota-Fernandes, R. Velez-Cruz, I. Iltis, D. Biard, and J.M. Egly. 2010. NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol Cell*. 38:54-66.
- Lehmann, A.R. 2003. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*. 85:1101-1111.
- Luijsterburg, M.S., M. Lindh, K. Acs, M.G. Vrouwe, A. Pines, H. van Attikum, L.H. Mullenders, and N.P. Dantuma. 2012. DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *The Journal of cell biology*. 197:267-281.

- O'Donovan, A., A.A. Davies, J.G. Moggs, S.C. West, and R.D. Wood. 1994. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature*. 371:432-435.
- Ogi, T., S. Limsirichaikul, R.M. Overmeer, M. Volker, K. Takenaka, R. Cloney, Y. Nakazawa, A. Niimi, Y. Miki, N.G. Jaspers, L.H. Mullenders, S. Yamashita, M.I. Fousteri, and A.R. Lehmann. 2010. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell*. 37:714-727.
- Oksenysh, V., B.B. de Jesus, A. Zhovmer, J.M. Egly, and F. Coin. 2009. Molecular insights into the recruitment of TFIIH to sites of DNA damage. *EMBO J*. 28:2971-2980.
- Riedl, T., F. Hanaoka, and J.M. Egly. 2003. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J*. 22:5293-5303.
- Schmitz, K.M., N. Schmitt, U. Hoffmann-Rohrer, A. Schafer, I. Grummt, and C. Mayer. 2009. TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol Cell*. 33:344-353.
- Sijbers, A.M., W.L. de Laat, R.R. Ariza, M. Biggerstaff, Y.F. Wei, J.G. Moggs, K.C. Carter, B.K. Shell, E. Evans, M.C. de Jong, S. Rademakers, J. de Rooij, N.G. Jaspers, J.H. Hoeijmakers, and R.D. Wood. 1996. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell*. 86:811-822.
- Soutoglou, E., and T. Misteli. 2008. Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science*. 320:1507-1510.
- Su, Y., B. Orelli, A. Madireddy, L.J. Niedernhofer, and O.D. Scharer. 2012. Multiple DNA binding domains mediate the function of the ERCC1-XPF protein in nucleotide excision repair. *J Biol Chem*. 287:21846-21855.
- Sugasawa, K. 2008. XPC: its product and biological roles. *Advances in experimental medicine and biology*. 637:47-56.
- Sugasawa, K., J. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P. van der Spek, A. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma, and J. Hoeijmakers. 1998. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 2:223-232.
- Tang, J.Y., B.J. Hwang, J.M. Ford, P.C. Hanawalt, and G. Chu. 2000. Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. *Mol Cell*. 5:737-744.
- Tumbar, T., G. Sudlow, and A.S. Belmont. 1999. Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *The Journal of cell biology*. 145:1341-1354.
- Uchida, A., K. Sugasawa, C. Masutani, N. Dohmae, M. Araki, M. Yokoi, Y. Ohkuma, and F. Hanaoka. 2002. The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH. *DNA Repair (Amst)*. 1:449-461.
- Unsal-Kacmaz, K., P.D. Chastain, P.P. Qu, P. Minoo, M. Cordeiro-Stone, A. Sancar, and W.K. Kaufmann. 2007. The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Molecular and cellular biology*. 27:3131-3142.
- Volker, M., M.J. Mone, P. Karmakar, A. van Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J.H. Hoeijmakers, R. van Driel, A.A. van Zeeland, and L.H. Mullenders. 2001. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell*. 8:213-224.
- Zhovmer, A., V. Oksenysh, and F. Coin. 2010. Two sides of the same coin: TFIIH complexes in transcription and DNA repair. *ScientificWorldJournal*. 10:633-643.

Figure legends

Figure 1: Tethering XPC to undamaged chromatin triggers the recruitment of TFIIH.

(A), Schematic representation of the GFP-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾, GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ and GFP-LacR. For clarity, the sizes of the GFP (238aa) and LacR (367aa) were omitted. **(B)**, Proteins from whole cell extracts (15µg) of U2OS either expressing GFP-LacR, GFP-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ or GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ were resolved by SDS-PAGE followed by Western-blotting using an anti-XPC antibody. **(C-D-E-F)**, Recruitment of hHR23b (C), XPB (D), RFP-TTDA (E) and flag-XPA (F) to tethered GFP-LacR (a-c) or GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ (d-f). Note that anti-hHR23b antibody produced an important staining of the nucleoli in U2OS cells. Circles indicate LacO arrays. **(G-J)**, The values on the graphs represent % of colocalisation of hHR23b (G), XPB (H), TTDA (I) and XPA (J) with GFP on the array based on three independent experiments with s.d.

Figure 2: Defining TFIIH- and hHR23b-interacting domains in XPC.

(A), Schematic representation of the wild-type and mutant XPC constructs. For clarity, the sizes of the GFP (238aa) and LacR (367aa) were omitted. **(B)**, Proteins from whole cell extracts (15µg) of U2OS17 expressing wild-type or mutant XPC proteins were resolved by SDS-PAGE followed by Western-blotting using anti-GFP antibody. **(C-D)**, Recruitment of hHR23b (C) and XPB (D) to tethered GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ (a-c), GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁵⁷⁹⁾ (d-f), GFP-LacR-XPC⁽¹⁻²⁰⁰⁾ (g-i) or GFP-LacR-XPC^(□□□□9□□□) (j-l). The values on the graphs represent % of colocalisation of each NER factor with GFP on the array based on three independent experiments with s.d. Circles indicate LacO arrays. **(E)**, Following transfection of GFP-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ or GFP-XPC⁽²⁰⁰⁻⁹⁴⁰⁾, XP-C cells were locally UV-irradiated (150J/m²), fixed 15 minutes later and stained with antibodies raised against GFP, XPB and UV-induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers (CPD). The values on the graphs represent % of colocalisation of XPB with GFP on the local UV array based on three independent experiments with s.d. Arrows indicate locally irradiated areas.

Figure 3: Tethering XPB to chromatin triggers the recruitment of downstream NER factors. (A), Schematic representation of the XPB⁽¹⁻⁷⁸²⁾-LacR-GFP and XPB⁽¹⁻⁷⁸²⁾-GFP. For clarity, the sizes of the GFP (238aa) and LacR (367aa) were omitted. (B), Lanes 1-3: Proteins from whole cell extracts (15µg) of U2OS17 expressing XPB proteins were resolved by SDS-PAGE followed by Western-blotting using anti-XPB antibodies. Lanes 4-6, TFIIH from 300µg of U2OS17 extracts was immunoprecipitated with an anti-p62 antibody and resolved by SDS-PAGE followed by Western-blotting with an anti-XPB antibody. The star indicates the endogenous XPB. (C-G), Recruitment of XPC (C), hHR23b (D), RFP-TTDA (E), Flag-XPA (F) and HA-XPF (G) to tethered XPB-LacR-GFP (a-c). The values on the graphs represent % of colocalisation of each NER factor with GFP on the array based on three independent experiments with s.d. Circles indicate LacO arrays.

Figure 4: XPC is recruited to tethered DDB2. (A), Top panel; Schematic representation of the YFP-DDB2⁽¹⁻⁴²⁷⁾ and YFP-LacR-DDB2⁽¹⁻⁴²⁷⁾. For clarity, the sizes of the YFP (238aa) and LacR (367aa) were omitted. Right panel; Proteins from whole cell extracts (15µg) of U2OS17 expressing either YFP-DDB2⁽¹⁻⁴²⁷⁾ or YFP-LacR-DDB2⁽¹⁻⁴²⁷⁾ were resolved by SDS-PAGE followed by Western-blotting using anti-GFP antibodies. (B-D), Recruitment of XPC (B), XPB (C) or flag-XPA (D) to tethered YFP-LacR-DDB2⁽¹⁻⁴²⁷⁾. The values on the graphs represent % of colocalisation of each NER factor with YFP on the array based on three independent experiments with s.d. Circles indicate LacO arrays.

Figure 5: The N-ter domain of TTDA recruits XPA to damaged DNA. (A), Schematic representation of the TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾-GFP, TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾-LacR-GFP and TTDA⁽¹⁵⁻⁷¹⁾-LacR-GFP. For clarity, the sizes of the GFP (238aa) and LacR (367aa) were omitted. (B), Proteins from whole cell extracts (15µg) of U2OS17 expressing TTDA proteins were resolved by SDS-PAGE followed by Western-blotting using anti-GFP antibodies. (C-E), Recruitment of XPC

(C), XPB (D) and Flag-XPA (E) to either tethered TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾-LacR-GFP or TTDA⁽¹⁵⁻⁷¹⁾-LacR-GFP as indicated. The values on the graphs represent % of colocalisation of each NER factor with GFP on the array based on three independent experiments with s.d. Circles indicate LacO arrays. **(F)**, Flag-TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾ or Flag-TTDA⁽¹⁵⁻⁷¹⁾ were expressed in *E.coli* and immunoprecipitated with anti-flag antibody covered beads. Following washes, the beads were incubated with bacterial extracts expressing XPD, p52 or XPA. Pull-down fractions were washed, resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-XPD, p52 and XPA antibodies (top panel) or anti-Flag antibody (Bottom panel). **(G)**, 10 and 30ng of either flag-TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾ or flag-TTDA⁽¹⁵⁻⁷¹⁾ were tested in a dual incision assay (NER) containing the recombinant XPC-HR23b, recombinant TFIIH lacking TTDA (IIH9) (Coin et al., 2006), XPA, RPA, XPG, ERCC1-XPF factors and a closed-circular plasmid containing a single 1,3-intra strand d(GpTpG) cisplatin-DNA cross-link (Pt-DNA) as a template. Sizes of the incision products are indicated. **(H)**, Immobilized biotinylated damaged DNA was incubated with XPC/hHR23B, IIH9, XPA and either flag-TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾ or flag-TTDA⁽¹⁵⁻⁷¹⁾ as indicated (Preinc), for 15 min at 30°C with ATP. DNA was washed, supplemented with XPC/hHR23b, purified TFIIH from HeLa, RPA, ERCC1-XPF and XPG without XPA and subjected to dual incision assay. In lane 3, all the NER factors were added in a single step with immobilized damaged DNA and subjected to dual incision.

Figure 1

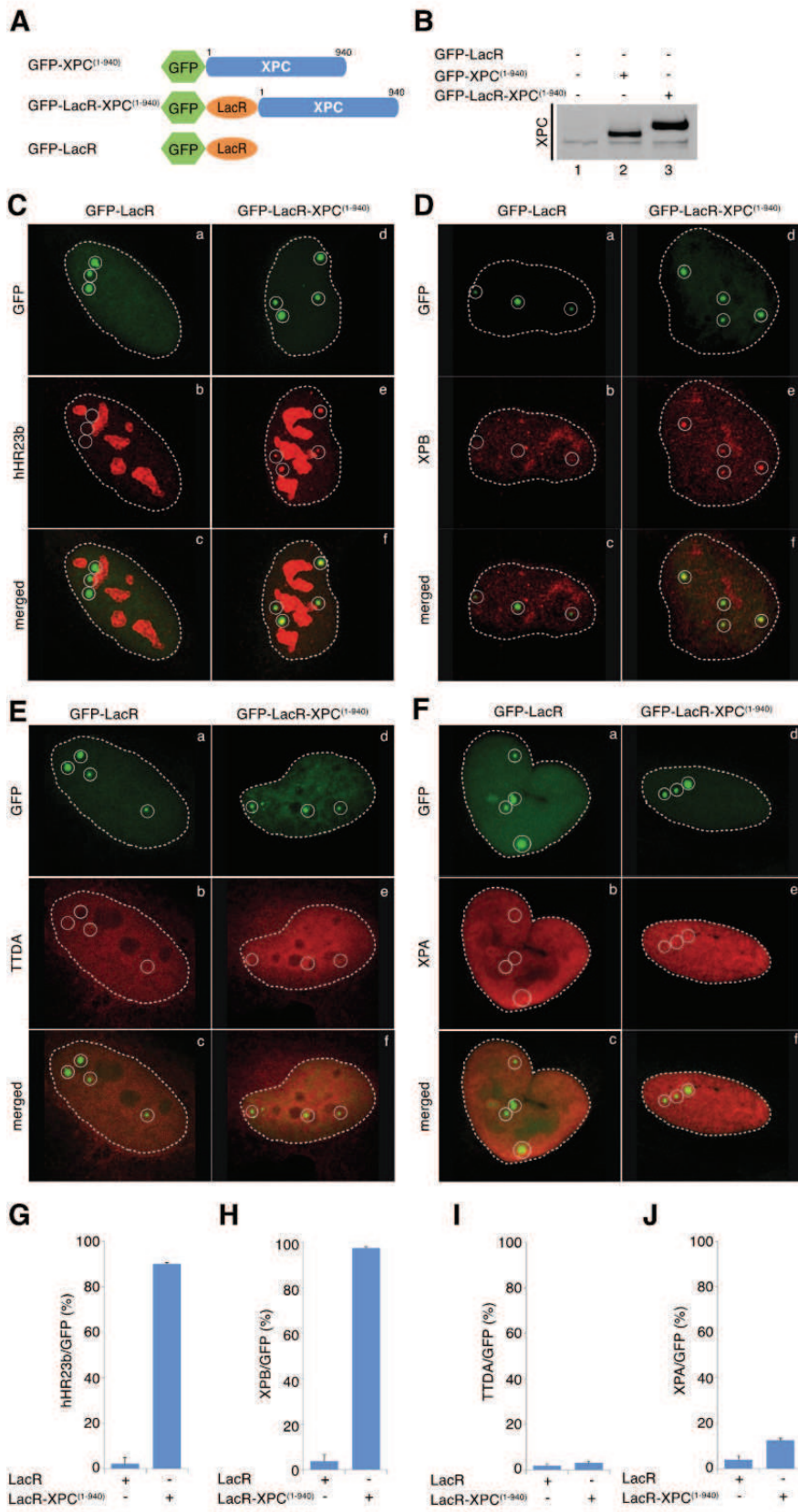


Figure 2

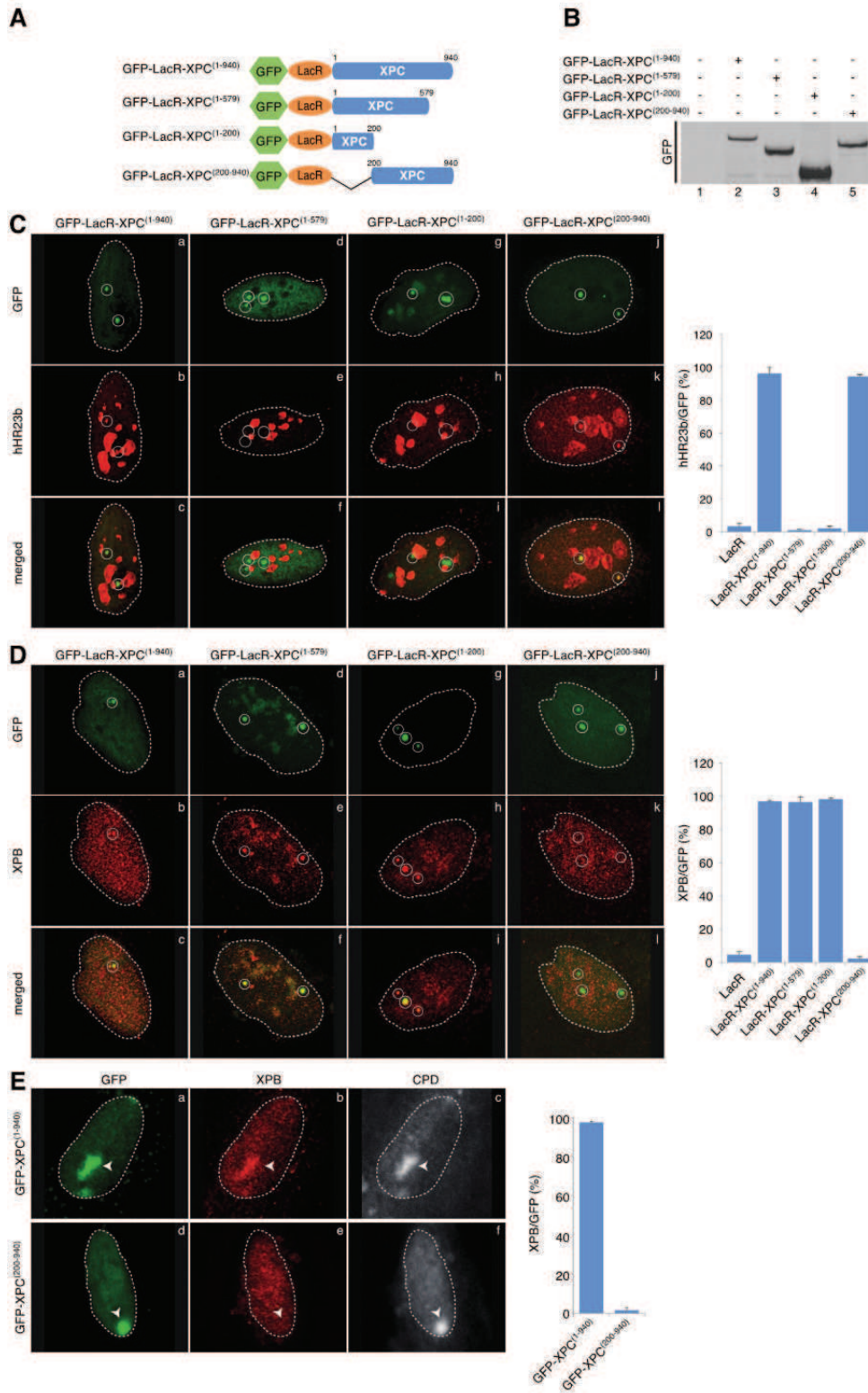


Figure 3

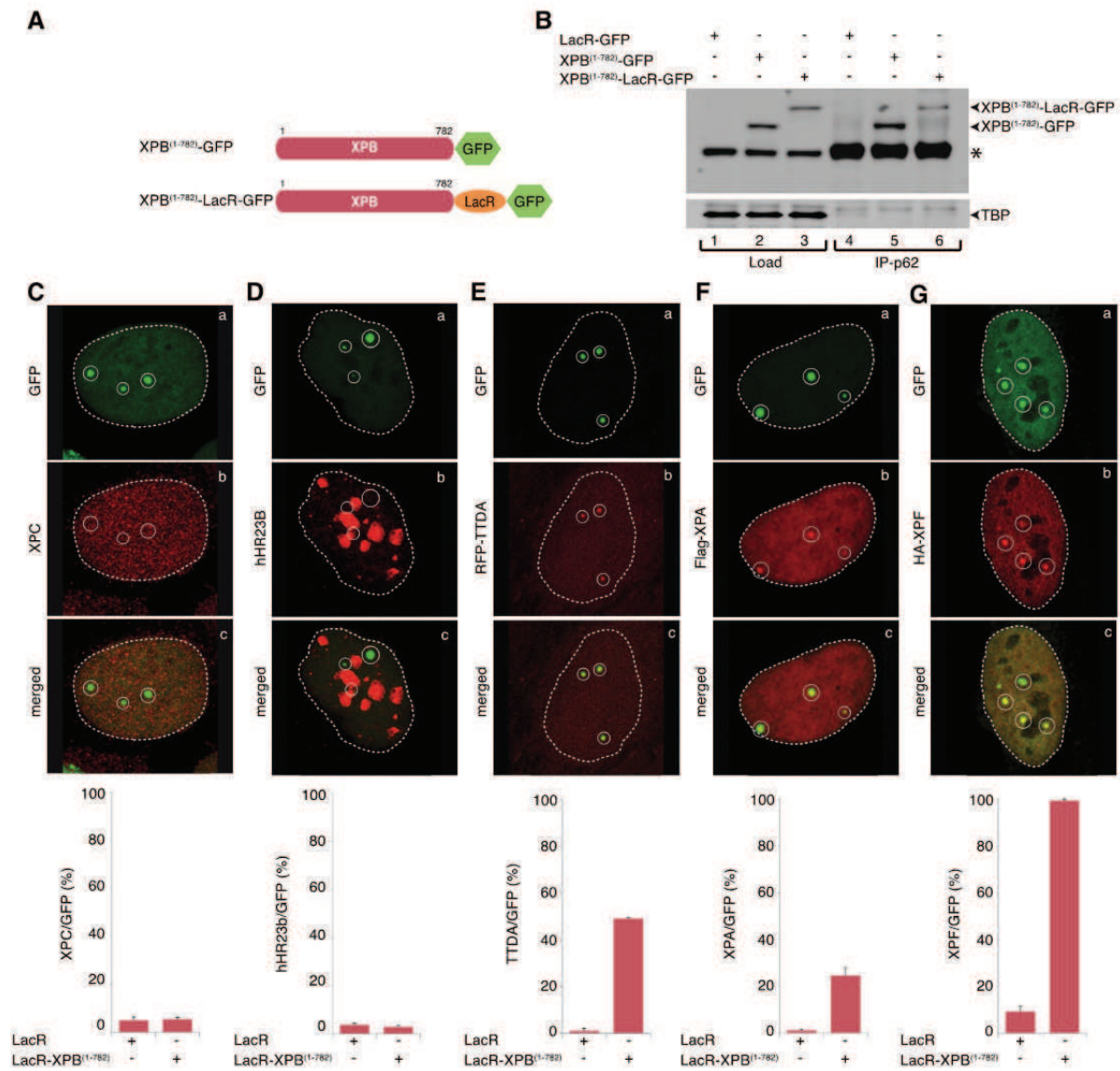


Figure 4

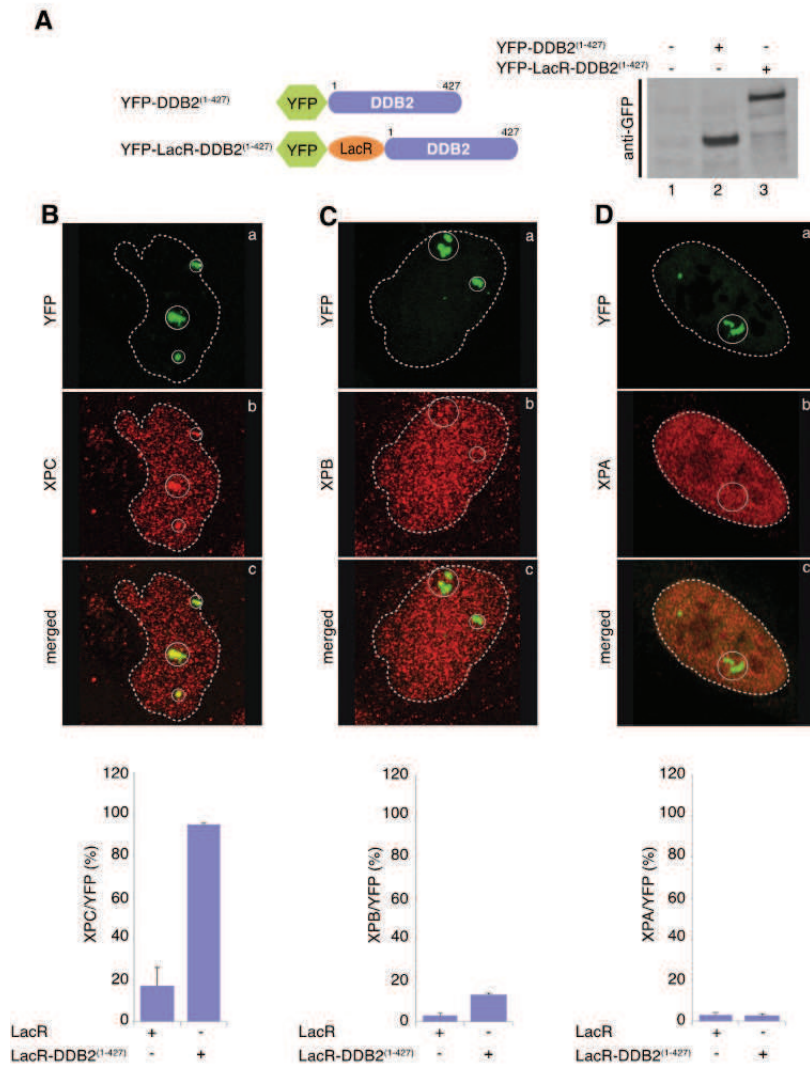
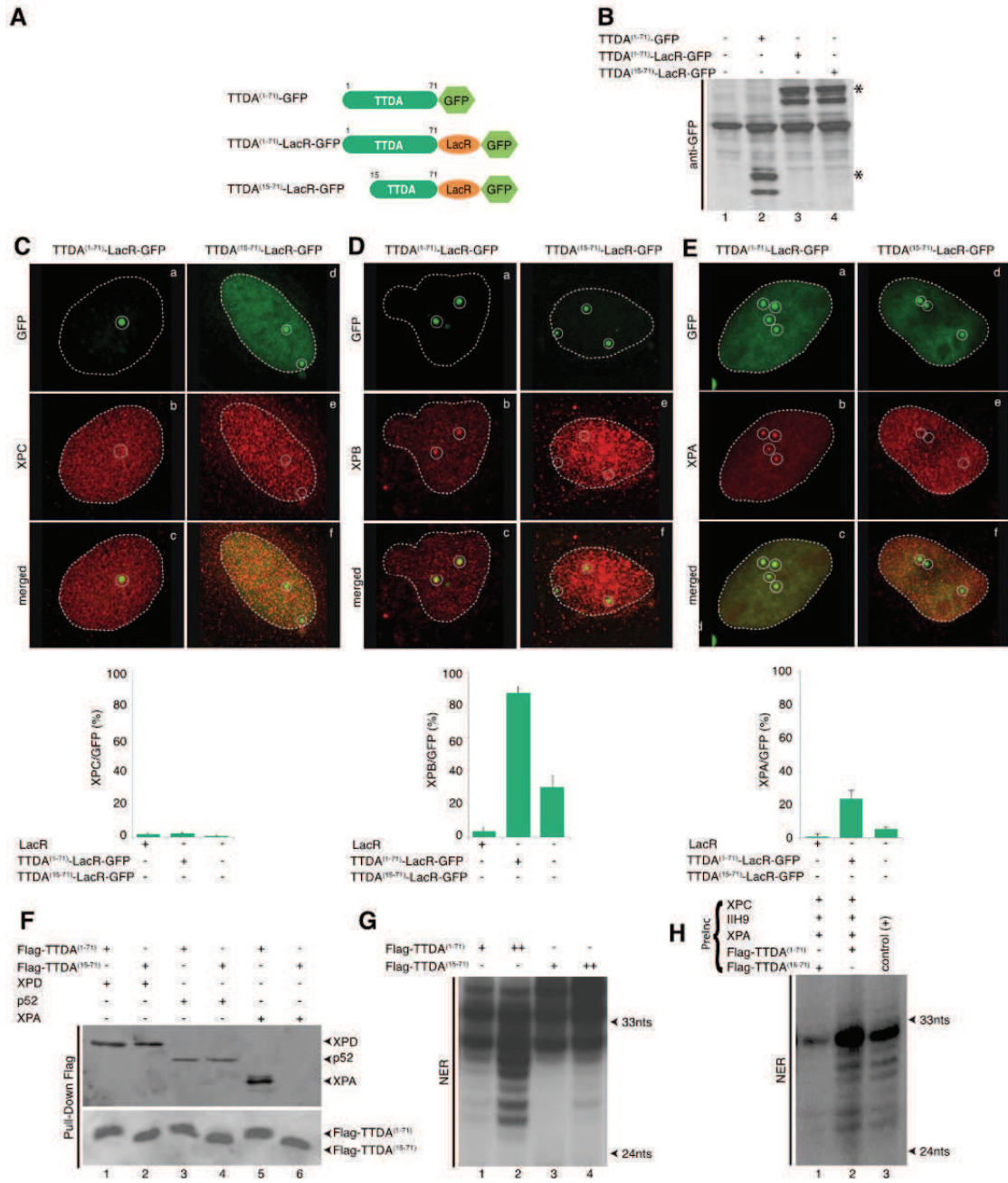


Figure 5



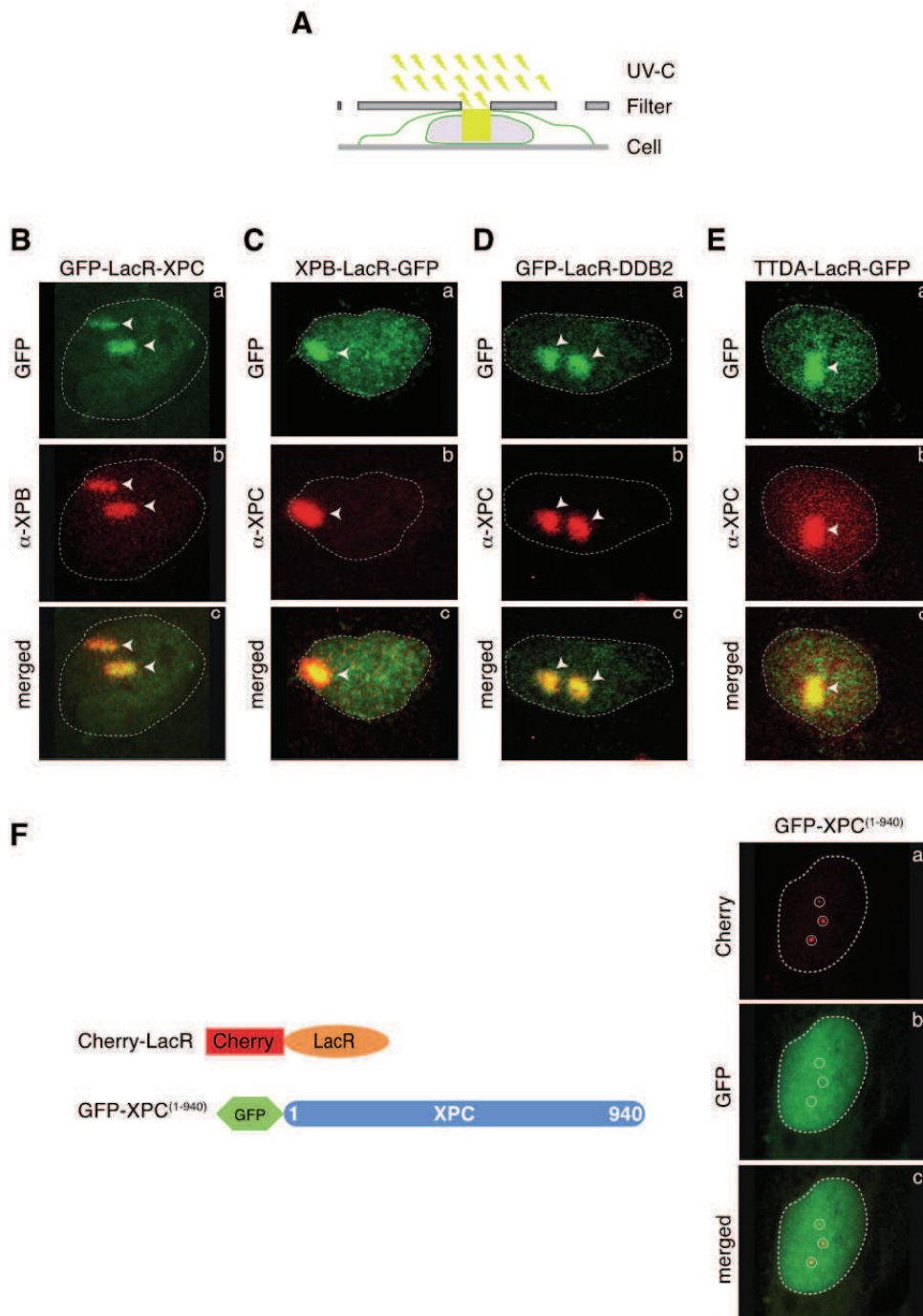
Supplemental Figures

Figure S1. GFP-LacR fusion constructs get recruited to UV irradiated regions of the DNA *in vivo*. (A). Schematic representation of the local irradiation experiment. Cells are covered with a millipore filter with 5 μM pores and UV-irradiated to produce local UV DNA damage. (B-E). Following transfection of GFP-LacR-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ (B), XPB⁽¹⁻⁷⁸²⁾-LacR-GFP (C), TTDA⁽¹⁻⁷¹⁾-LacR-GFP (E) or GFP-LacR-DDB2⁽¹⁻⁴²⁷⁾ (D), U2OS cells were locally UV-irradiated (150 J/m²), fixed 15 minutes later and stained with an antibody raised against either XPB or XPC (as indicated). Arrows indicate locally irradiated areas. (F). Left panel; Schematic representation of the Cherry-LacR and GFP-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ constructs. Right panel; Recruitment of Cherry-LacR (a) and GFP-XPC⁽¹⁻⁹⁴⁰⁾ (b) to the LacO repeats in U2OS17 cells.

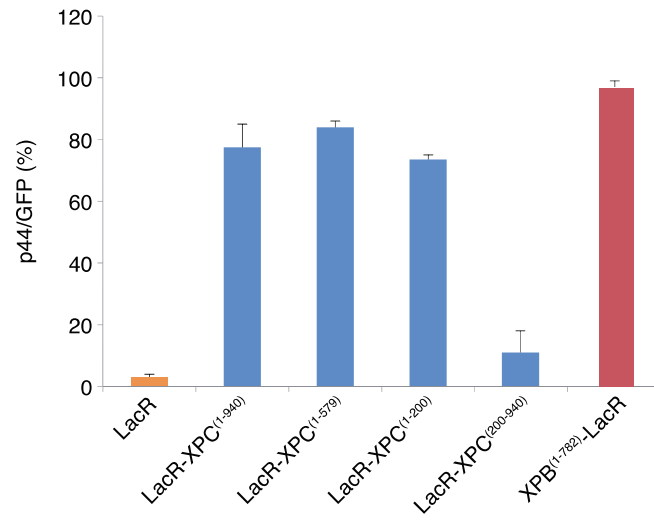
Figure S2. p44 localization frequency to the array in the presence of different tethered GFP-LacR fusion proteins. The values of the graph represent % of colocalisation of the TFIIH subunit p44 on the array with the various GFP-LacR fusion constructs as indicated at the bottom of the graph. Values represent the means and s.d of three independent experiments.

Figure S3: Model of PlnC assembly on undamaged chromatin. (A), Model for the ordered complex-assembly steps achieved by tethering different NER factors to chromatin. (B), Schematic representation of XPC. The interacting domains of XPC with hHR23b and TFIIH in solution (at the top) or on chromatin (at the bottom) are indicated. Positions of amino acids are indicated.

Supplementary Figure S1

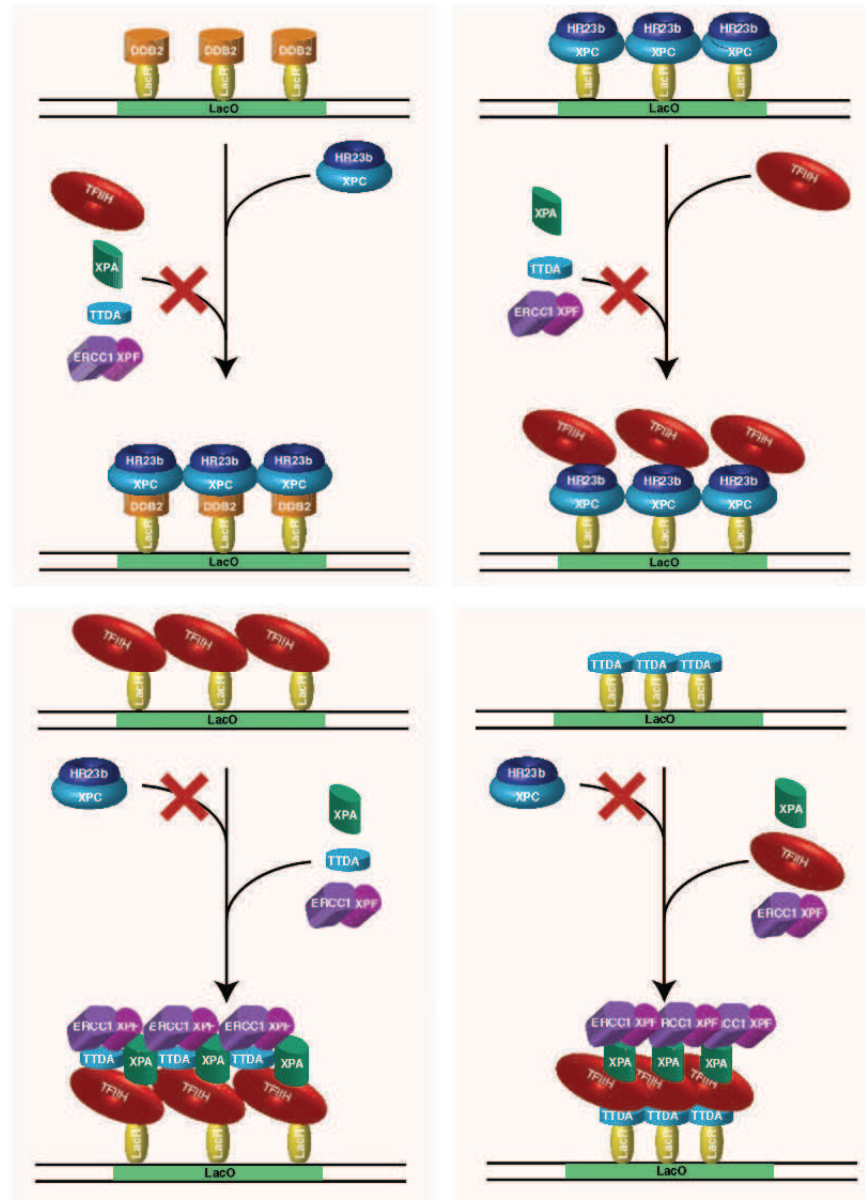


Supplemental Figure S2

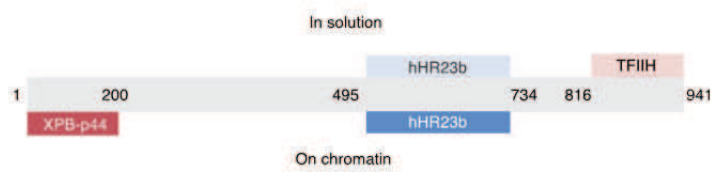


Supplementary Figure S3

A



B



Supplemental data

Antibody	References	Dilution
hHR23B	BD Transduction Laboratories, 611018 mouse	1:500
XPC	Home made IGBMC, 2C11, mouse	1:4000
XPC	Bethyl, A301-122A, rabbit	1:3000
XPB	Home made, 1B3, mouse	1:4000
XPB	Santa Cruz, (S-19) sc-293, rabbit	1:1000
XPD	Home made IGBMC, 2F6, mouse	1:2000
p44	Home made IGBMC, 1H5, mouse	1:2000
p52	Home made IGBMC, 1D11, mouse	1:2000
XPA	GenWay, Ab-1 IgG2a KAPPA clone 12F5	1:250
HA tag	Roche, clone 3F10, mouse	1:300
Flag tag	Sigma, F7425, rabbit	1:2000
p62	Santa Cruz, (Q-19) sc-292, rabbit	1:2000

Discussion

Bien avant l'élucidation de son rôle actif dans la réparation NER, TFIIH était connu pour être impliqué dans la transcription de gènes dépendants de l'ARNPII (initiation, échappée du promoteur et début de l'élongation). Récemment, il a été montré que d'autres facteurs NER, plus précisément ceux composant le PInC, étaient recrutés sur la chromatine lors de la transcription, et en absence de dommages de l'ADN (Kamileri et al., 2012). En effet, *Le May et al.* a observé qu'après traitement des cellules par l'acide rétinoïque, il y avait engagement de la machinerie de transcription ARNPII, y compris de TFIIH, mais aussi le recrutement séquentiel et ordonné des autres facteurs constituant le PInC (XPC, XPA, RPA, XPG et XPF-ERCC1 respectivement) sur le promoteur du gène activé *RARβ2*, et ce, en l'absence de stimuli génotoxiques. L'addition d'un inhibiteur de transcription a empêché le recrutement de ces facteurs NER, mais n'a pas altéré leur activité de réparation après irradiation UV, indiquant que l'assemblage du PInC lors de la transcription est indépendant de la réparation NER (Le May et al., 2010).

En revanche, au cours de la réparation NER, la reconnaissance d'une lésion distordant la double hélice d'ADN par hHR23B/XPC, est décrite comme étant nécessaire au recrutement de cette dernière et à l'assemblage du PInC (Fong et al., 2013; Venema et al., 1990). Afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire régissant le recrutement de ces facteurs et de déterminer le rôle précis de la lésion dans la formation du PInC en NER, nous avons utilisé le système LacO/lacR pour provoquer l'immobilisation de plusieurs facteurs de la NER dont DDB2, XPC, XPB et TTDA sur la chromatine en l'absence de dommages de l'ADN, et par des marquages IF nous avons évalué l'assemblage du PInC.

1. l'immobilisation de facteurs NER permet la formation séquentielle du PInC

Lors de l'immobilisation de XPC sur la chromatine grâce à ce système artificiel, nous avons observé un assemblage partiel du PInC, avec les seuls recrutements de hHR23B et de TFIIH (XPB et P44) à l'exception notable de la sous-unité TTDA. Nous avons conscience que la présence d'un tag GFP-LacR peut engendrer des perturbations dans les interactions de XPC avec ses partenaires, c'est pourquoi nous avons pris soins de montrer la fonctionnalité de notre

construction qui restaure la réparation de l'ADN endommagé lorsqu'il est transfecté dans des cellules déficientes en XPC.

Nous avons provoqué ensuite la séquestration de TFIIH sur la séquence Lac-Operateur, par immobilisation de XPB ou de TTDA, ce qui a permis le recrutement d'autres facteurs en aval, en l'occurrence XPA et l'endonucléase XPF/ERCC1 indiquant ainsi la complétion de l'assemblage du PlnC. En revanche nous n'avons pas observé de recrutement de XPC, qui intervient en amont de TFIIH lors d'une réaction NER classique, alors qu'il est recruté lors de l'immobilisation de DDB2, dont l'engagement sur les lésions UV-induites ne nécessite pas la présence de XPC (Alekseev et al., 2008, p. 2). Ceci est en concordance avec ce qui a été observé lors de la réparation NER, où le recrutement de facteurs en aval de TFIIH sur le site de réparation provoque la libération de XPC/hHR23B. En effet, il a été montré que l'addition de RPA et XPA rompait l'interaction de XPC/hHR23B avec l'ADN endommagé *in vitro* (You et al., 2003), Riedl et al. a quant à lui montré que l'arrivée de XPA, RPA et XPG provoquait le détachement de XPC/hHR23B du complexe NER-C1 (XPC/hHR23B et TFIIH liés à de l'ADN comportant une lésion cisplatine) (Riedl et al., 2003). Notre système LacO/LacR appuie donc l'hypothèse selon laquelle, la présence simultanée de XPC, TFIIH et XPA sur la chromatine ne serait pas possible en raison d'une éventuelle compétition stérique entre XPC et XPA lors de l'interaction avec TFIIH sur la chromatine endommagée.

Ces données nous permettent de conclure que l'assemblage du PlnC dans notre système artificiel se fait de façon séquentielle et ordonnée, similaire à ce qui a lieu dans une réaction NER naturelle. Ce qui en revanche, n'a pas été observé dans d'autres travaux ayant utilisé ce même système pour étudier l'assemblage d'autres gros complexes cellulaires, où l'immobilisation d'un facteur quelle que soit son ordre d'arrivée dans la voie naturelle induisait le recrutement des autres partenaires.

Le système LacO/LacR a en effet été utilisé pour étudier le mécanisme de réponse aux cassures double brin ou DDR (DNA damage response) (**fig HR**). Il a été observé que la séquestration sur la chromatine, de NBS1, MRE11 ou même de MDC1 qui est recrutée en aval dans la voie naturelle, était suffisante pour activer la réponse DDR, par le recrutement des autres facteurs, et la phosphorylation de γ H2AX, de NBS1 et d'ATM (Soutoglou and Misteli, 2008). Il en était de même dans

l'étude de la formation des Corps de Cajal (Cajal bodies), sites de maturation des ribonucléoprotéines impliquées dans l'épissage, la maturation des ARNm d'histones et la formation des télomères (Hebert, 2013), où il a été montré que l'immobilisation d'une des protéines de ce complexe par le système LacO/LacR, permettait le recrutement de toutes les autres, et de façon non hiérarchisée (Kaiser et al., 2008).

2. TTDA joue un rôle clé dans l'assemblage du PInC

Comme cité précédemment, l'immobilisation de XPC sur la chromatine, a permis un assemblage incomplet du PInC, en ne recrutant que hHR23B et le complexe TFIIH à l'exception de la sous-unité TTDA, alors que la présence de cette dernière sur la chromatine, lors de l'immobilisation de XPB-lacR ou de TTDA-lacR, a permis la complétion de l'assemblage du PInC, comme l'indique le recrutement de XPA et de l'endonucléase XPF. Ceci suggère que la sous-unité TTDA de TFIIH joue un rôle important dans l'assemblage du PInC.

Dans une étude visant à évaluer la dynamique de l'interaction de cette protéine avec TFIIH, *Giglia-Mari et al* a observé que l'irradiation localisée à 488nm de cellules exprimant des formes taguées GFP des protéines NER, après traitement à l'Actinomycine D (intercalant de l'ADN qui excité à 488nm, induit une distorsion réversible de la double hélice représentant un faux substrat pour la réparation NER) provoquait la formation d'un PInC abortif : recrutement de XPC-GFP, de XPB-GFP mais pas de TTDA-GFP ni de XPA-GFP ou ERCC1-GFP. Cette étude a permis de démontrer que TTDA était caractérisée par un équilibre entre une forme libre diffusant entre le noyau et le cytoplasme, et une forme liée au TFIIH vers laquelle se déplace l'équilibre en cas de réparation NER, probablement pour stabiliser le complexe sur le site de réparation et permettre le recrutement des autres facteurs (Giglia-Mari et al., 2006; Vitorino et al., 2007b).

La capacité de TTDA à compléter l'assemblage du PInC est altérée dans notre système par la délétion des 15 amino-acides N-terminaux, qui provoque une réduction du taux de recrutement de XPB et de XPA sur les sites LacO (lors de l'immobilisation de de TTDA¹⁵⁻⁷¹-LacR). Nous expliquons cela par l'altération de l'interaction de cette sous-unité de TFIIH avec XPA, comme le prouve, d'un coté, le test de pull down dans lequel, cette forme tronquée de la protéine n'interagissait pas

avec XPA contrairement à la protéine complète, et de l'autre, les test de double incision *in vitro* ayant montré que cette délétion empêchait le recrutement de XPA sur la lésion de l'ADN.

Cette forme tronquée de TTDA correspond à la protéine qui peut être produite suite à une mutation modifiant le codon d'initiation de la traduction et qui est présente de façon homozygote chez les patients TTD-A : TTD13PV et TTD14PV. Un second codon ATG est situé 15 codons en aval et pourrait servir de codon d'initiation pour une forme tronquée de TTDA. Cette forme n'a jamais été mise en évidence au niveau protéique, mais des travaux récents montrant que le KO de TTDA est létal chez la souris (Theil et al., 2013), suggèrent qu'elle doit exister chez les patients porteurs d'une telle mutation. Cette mutation induit une baisse significative du taux de TFIIH (Vermeulen et al., 2000), ce qui indique le rôle important de cette sous-unité dans la stabilité du complexe. Elle provoque également une sensibilité modérée aux UV (Giglia-Mari et al., 2004), et une activité NER ralentie par rapport aux cellules WT, observée lors de la mesure cinétique de l'activité UDS (unscheduled DNA synthesis), et du taux de réparation des lésions 6-4PP. Ce défaut n'est pas dû au faible taux de TFIIH, mais à sa constitution chimique et physique qui ne permet pas dans ce cas, le recrutement normal des autres facteurs en aval (Theil et al., 2011).

Grace à notre système LacO/LacR nous avons pu confirmer le rôle clé de TTDA dans l'assemblage du PlnC, et en particulier la région N-terminale responsable de l'interaction avec XPA, et pu donc élucider le défaut de réparation NER présent chez les patients TTD-A portant la mutation M1T (patients TTD13PV et TTD14PV) qui ne s'explique pas seulement par la baisse du taux de TFIIH, mais aussi par l'altération du recrutement de XPA sur les sites de réparation NER. Ceci montre que le système LacO/LacR n'est pas seulement utile pour analyser la formation de complexes protéiques mais qu'il peut également être utile pour comprendre des situations pathologiques complexes. Dans le cas de TTDA, ce système nous a permis de nous affranchir de l'impact de TTDA sur la concentration de TFIIH *in vivo* et d'analyser uniquement les conséquences de cette mutation sur les interactions protéiques et leur conséquence sur la formation de complexes. Il s'agit là d'un point important car ce système n'avait pas encore été utilisé à notre connaissance pour ce type d'analyse en condition pathologique.

3. Domaines d'interaction de XPC avec hHR23B et TFIIH

En droite ligne de ce que nous avons montré au chapitre précédent, le système LacO/LacR nous a également permis de revisiter les domaines d'interaction de XPC avec hHR23B ou TFIIH. Dans ce but, nous avons provoqué l'immobilisation sur les répétitions LacO, de différentes formes tronquées de XPC. Nous avons ainsi observé qu'au niveau de la chromatine, c'était la partie C-terminale de XPC qui permettait son interaction avec hHR23B, car cette dernière n'est pas recrutée sur les sites d'immobilisation en présence des formes tronquées XPC¹⁻⁵⁷⁹ ou XPC¹⁻³⁰⁰. Ceci est en concordance avec ce qui a été observé *in vitro* par Uchida et al., où il avait été montré que le domaine d'interaction avec hHR23B correspond aux AA 496 à 734 (Uchida et al., 2002).

Il a été démontré que XPC était responsable du recrutement de TFIIH sur les sites de réparation lors de la GG-NER, en interagissant avec les sous-unités XPB et P62 (Sugasawa, 2008; Yokoi et al., 2000). Des tests d'interaction *in vitro* ont déterminé la région C-terminale de XPC (AA 816 à 940) comme étant le domaine d'interaction avec TFIIH (Uchida et al., 2002). Cependant, dans notre système, la délétion de la région N-terminale (XPC²⁰⁰⁻⁹⁴⁰) a réduit significativement le taux de recrutement de XPB et P44, contrairement aux délétions C-terminales (XPC¹⁻⁵⁹⁷ et XPC¹⁻³⁰⁰) qui ont montré un taux de recrutement similaire à la protéine totale, indiquant qu'au niveau de la chromatine, le domaine N-terminal de XPC intervient dans le recrutement de TFIIH. Cette contradiction suggère une différence de comportement des complexes protéiques en solution *in vitro* et dans la cellule au niveau de la chromatine.

Il est vrai que dans des tests de double incision *in vitro* sur des extraits de cellules XP-C, l'addition de XPC¹⁻⁸¹⁵-hHR23B n'a pas eu d'effet de restauration de l'activité NER comparée à la forme WT. Mais l'addition de XPC¹¹⁸⁻⁹⁴⁰-hHR23B ne l'a restaurée que partiellement (35%) (Uchida et al., 2002), indiquant que la partie N-terminale de la protéine a aussi un rôle dans la réparation NER, que nous illustrons avec le système LacO/LacR.

Par ailleurs, 18 mutations différentes de ce gène ont été référencées chez les patients *Xéoderma pigmentosum* groupe C, où elles induisent une baisse

importante du taux de mRNA de XPC, une sensibilité aux UV et une baisse de l'activité NER. Ces mutations sont réparties tout le long du gène, sans distinction d'aucun « point chaud » (Chavanne et al., 2000), ce qui suggère que la totalité de la protéine est importante pour l'activité NER, dont la région N-terminale. Nous avons analysé le comportement de cette forme tronquée de XPC dans des conditions physiologiques et démontré qu'elle ne permettait pas le recrutement de TFIIH au niveau des sites de dommages à l'ADN, confirmant ce que le système LacO/LacR nous avait montré.

En conclusion, le système LacO/LacR, utilisé jusqu'ici pour comprendre la formation de gros complexes protéiques peut également avoir une utilité importante pour disséquer les interactions protéiques simples en condition normale où pathologique. Il présente l'avantage d'être utilisé *in vivo* et sur de la chromatine, ce qui permet d'éviter les systèmes trop artificiels de GST pull down ou de co-expression dans des cellules d'insectes par le baculovirus. Il se situe ainsi dans un contexte d'interaction plus physiologique.

Références

- Aguilar-Fuentes, J., Fregoso, M., Herrera, M., Reynaud, E., Braun, C., Egly, J.M., Zurita, M., 2008. p8/TTDA Overexpression Enhances UV-Irradiation Resistance and Suppresses TFIIH Mutations in a *Drosophila* Trichothiodystrophy Model. *PLoS Genet.* 4. doi:10.1371/journal.pgen.1000253
- Alekseev, S., Luijsterburg, M.S., Pines, A., Geverts, B., Mari, P.-O., Giglia-Mari, G., Lans, H., Houtsmuller, A.B., Mullenders, L.H.F., Hoeijmakers, J.H.J., Vermeulen, W., 2008. Cellular Concentrations of DDB2 Regulate Dynamic Binding of DDB1 at UV-Induced DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* 28, 7402–7413. doi:10.1128/MCB.01108-08
- Botta, E., Nardo, T., Lehmann, A.R., Egly, J.-M., Pedrini, A.M., Stefanini, M., 2002. Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2919–2928. doi:10.1093/hmg/11.23.2919
- Botta, E., Offman, J., Nardo, T., Ricotti, R., Zambruno, G., Sansone, D., Balestri, P., Raams, A., Kleijer, W.J., Jaspers, N.G.J., Sarasin, A., Lehmann, A.R., Stefanini, M., 2007. Mutations in the C7orf11 (TTDN1) gene in six nonphotosensitive trichothiodystrophy patients: no obvious genotype-phenotype relationships. *Hum. Mutat.* 28, 92–96. doi:10.1002/humu.20419
- Bradsher, J., Coin, F., Egly, J.M., 2000. Distinct roles for the helicases of TFIIH in transcript initiation and promoter escape. *J. Biol. Chem.* 275, 2532–2538.
- Chavanne, F., Broughton, B.C., Pietra, D., Nardo, T., Browitt, A., Lehmann, A.R., Stefanini, M., 2000. Mutations in the XPC Gene in Families with Xeroderma Pigmentosum and Consequences at the Cell, Protein, and Transcript Levels. *Cancer Res.* 60, 1974–1982.
- Clayton, P., Bonnemaire, M., Dutailly, P., Maisonobe, P., Naudin, L., Pham, E., Zhang, Z., Grupe, A., Thiagalingam, A., Denèfle, P., EPIGROW Study Group, 2013. Characterizing short stature by insulin-like growth factor axis status and genetic associations: results from the prospective, cross-sectional, epidemiogenetic EPIGROW study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E1122–1130. doi:10.1210/jc.2012-4283
- Cleaver, J.E., Lam, E.T., Revet, I., 2009. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat. Rev. Genet.* 10, 756–768. doi:10.1038/nrg2663
- Coin, F., De Santis, L.P., Nardo, T., Zlobinskaya, O., Stefanini, M., Egly, J.-M., 2006. p8/TTD-A as a Repair-Specific TFIIH Subunit. *Mol. Cell* 21, 215–226. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.024
- Coin, F., Oksenysh, V., Egly, J.-M., 2007. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol. Cell* 26, 245–256. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.009
- Coin, F., Oksenysh, V., Mocquet, V., Groh, S., Blattner, C., Egly, J.M., 2008. Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Mol. Cell* 31, 9–20. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.024
- Colella, S., Nardo, T., Mallery, D., Borrone, C., Ricci, R., Ruffa, G., Lehmann, A.R., Stefanini, M., 1999. Alterations in the CSB Gene in Three Italian Patients with the Severe Form of Cockayne Syndrome (CS) But Without Clinical Photosensitivity. *Hum. Mol. Genet.* 8, 935–941. doi:10.1093/hmg/8.5.935
- DiGiovanna, J.J., Kraemer, K.H., 2012. Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J. Invest. Dermatol.* 132, 785–796. doi:10.1038/jid.2011.426
- Faghri, S., Tamura, D., Kraemer, K.H., Digiovanna, J.J., 2008. Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterises a wide spectrum of clinical manifestations. *J. Med. Genet.* 45, 609–621. doi:10.1136/jmg.2008.058743

- Filion, G.J.P., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E., Defossez, P.-A., 2006. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol. Cell. Biol.* 26, 169–181. doi:10.1128/MCB.26.1.169-181.2006
- Fong, Y.W., Cattoglio, C., Tjian, R., 2013. The Intertwined Roles of Transcription and Repair Proteins. *Mol. Cell* 52, 291–302. doi:10.1016/j.molcel.2013.10.018
- Fournier, A., Sasai, N., Nakao, M., Defossez, P.-A., 2011. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. *Brief. Funct. Genomics* e1r040. doi:10.1093/bfpg/11.1/e1r040
- Fousteri, M., Vermeulen, W., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F., 2006. Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II In Vivo. *Mol. Cell* 23, 471–482. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.029
- Gerard, M., Fischer, L., Moncollin, V., Chipoulet, J.M., Chambon, P., Egly, J.M., 1991. Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *J. Biol. Chem.* 266, 20940–20945.
- Giglia-Mari, G., Coin, F., Ranish, J.A., Hoogstraten, D., Theil, A., Wijgers, N., Jaspers, N.G.J., Raams, A., Argentini, M., van der Spek, P.J., Botta, E., Stefanini, M., Egly, J.-M., Aebersold, R., Hoeijmakers, J.H.J., Vermeulen, W., 2004. A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat. Genet.* 36, 714–719. doi:10.1038/ng1387
- Giglia-Mari, G., Miquel, C., Theil, A.F., Mari, P.-O., Hoogstraten, D., Ng, J.M.Y., Dinant, C., Hoeijmakers, J.H.J., Vermeulen, W., 2006. Dynamic Interaction of TTDA with TFIIH Is Stabilized by Nucleotide Excision Repair in Living Cells. *PLoS Biol.* 4. doi:10.1371/journal.pbio.0040156
- Gillet, L.C.J., Schärer, O.D., 2006. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* 106, 253–276. doi:10.1021/cr040483f
- Groisman, R., Kuraoka, I., Chevallier, O., Gaye, N., Magnaldo, T., Tanaka, K., Kisselev, A.F., Harel-Bellan, A., Nakatani, Y., 2006. CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev.* 20, 1429–1434. doi:10.1101/gad.378206
- Hashimoto, S., Egly, J.M., 2009. Trichothiodystrophy view from the molecular basis of DNA repair/transcription factor TFIIH. *Hum. Mol. Genet.* 18, R224–R230. doi:10.1093/hmg/ddp390
- Hebert, M.D., 2013. Signals controlling Cajal body assembly and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1314–1317. doi:10.1016/j.biocel.2013.03.019
- Hess, M.T., Schwitter, U., Petretta, M., Giese, B., Naegeli, H., 1997. Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6664–6669.
- Hey, T., Lipps, G., Sugawara, K., Iwai, S., Hanaoka, F., Krauss, G., 2002. The XPC-HR23B complex displays high affinity and specificity for damaged DNA in a true-equilibrium fluorescence assay. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 6583–6587.
- Hirose, Y., Ohkuma, Y., 2007. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 601–608. doi:10.1093/jb/mvm090
- Hoeijmakers, J.H.J., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374. doi:10.1038/35077232
- Itin, P.H., Sarasin, A., Pittelkow, M.R., 2001. Trichothiodystrophy: Update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *J. Am. Acad. Dermatol.* 44, 891–924. doi:10.1067/mjd.2001.114294

- Iyama, T., Wilson III, D.M., 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* 12, 620–636. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., Roos, W.P., 2007. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* 6, 1079–1099. doi:10.1016/j.dnarep.2007.03.008
- Kaiser, T.E., Intine, R.V., Dundr, M., 2008. De Novo Formation of a Subnuclear Body. *Science* 322, 1713–1717. doi:10.1126/science.1165216
- Kamileri, I., Karakasilioti, I., Garinis, G.A., 2012. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet.* 28, 566–573. doi:10.1016/j.tig.2012.06.004
- Keriel, A., Stary, A., Sarasin, A., Rochette-Egly, C., Egly, J.M., 2002. XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha. *Cell* 109, 125–135.
- Kim, J.-J., Park, Y.-M., Baik, K.-H., Choi, H.-Y., Yang, G.-S., Koh, I., Hwang, J.-A., Lee, J., Lee, Y.-S., Rhee, H., Kwon, T.S., Han, B.-G., Heath, K.E., Inoue, H., Yoo, H.-W., Park, K., Lee, J.-K., 2012. Exome sequencing and subsequent association studies identify five amino acid-altering variants influencing human height. *Hum. Genet.* 131, 471–478. doi:10.1007/s00439-011-1096-4
- Kote-Jarai, Z., Olama, A.A.A., Giles, G.G., Severi, G., Schleutker, J., Weischer, M., Campa, D., Riboli, E., Key, T., Gronberg, H., Hunter, D.J., Kraft, P., Thun, M.J., Ingles, S., Chanock, S., Albanes, D., Hayes, R.B., Neal, D.E., Hamdy, F.C., Donovan, J.L., Pharoah, P., Schumacher, F., Henderson, B.E., Stanford, J.L., Ostrander, E.A., Sorensen, K.D., Dörk, T., Andriole, G., Dickinson, J.L., Cybulski, C., Lubinski, J., Spurdle, A., Clements, J.A., Chambers, S., Aitken, J., Gardiner, R.A.F., Thibodeau, S.N., Schaid, D., John, E.M., Maier, C., Vogel, W., Cooney, K.A., Park, J.Y., Cannon-Albright, L., Brenner, H., Habuchi, T., Zhang, H.-W., Lu, Y.-J., Kaneva, R., Muir, K., Benlloch, S., Leongamornlert, D.A., Saunders, E.J., Tymrakiewicz, M., Mahmud, N., Guy, M., O'Brien, L.T., Wilkinson, R.A., Hall, A.L., Sawyer, E.J., Dadaev, T., Morrison, J., Dearnaley, D.P., Horwich, A., Huddart, R.A., Khoo, V.S., Parker, C.C., Van As, N., Woodhouse, C.J., Thompson, A., Christmas, T., Ogden, C., Cooper, C.S., Lophatonanon, A., Southey, M.C., Hopper, J.L., English, D.R., Wahlfors, T., Tammela, T.L.J., Klarskov, P., Nordestgaard, B.G., Røder, M.A., Tybjærg-Hansen, A., Bojesen, S.E., Travis, R., Canzian, F., Kaaks, R., Wiklund, F., Aly, M., Lindstrom, S., Diver, W.R., Gapstur, S., Stern, M.C., Corral, R., Virtamo, J., Cox, A., Haiman, C.A., Le Marchand, L., FitzGerald, L., Kolb, S., Kwon, E.M., Karyadi, D.M., Ørntoft, T.F., Borre, M., Meyer, A., Serth, J., Yeager, M., Berndt, S.I., Marthick, J.R., Patterson, B., Wokolorczyk, D., Batra, J., Lose, F., McDonnell, S.K., Joshi, A.D., Shahabi, A., Rinkleb, A.E., Ray, A., Sellers, T.A., Lin, H.-Y., Stephenson, R.A., Farnham, J., Muller, H., Rothenbacher, D., Tsuchiya, N., Narita, S., Cao, G.-W., Slavov, C., Mitev, V., Oncology, T.U.G.P.C.S.C.A. of U.S.S. of Collaborators, T.U.P.S., BioResource, T.A.P.C., Consortium, T.P., Easton, D.F., Eeles, R.A., 2011. Seven prostate cancer susceptibility loci identified by a multi-stage genome-wide association study. *Nat. Genet.* 43, 785–791. doi:10.1038/ng.882
- Kraemer, K.H., Lee, M.M., Scotto, J., 1984. DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis* 5, 511–514.
- Larrea, A.A., Lujan, S.A., Kunkel, T.A., 2010. SnapShot: DNA mismatch repair. *Cell* 141, 730.e1. doi:10.1016/j.cell.2010.05.002
- Le May, N., Mota-Fernandes, D., Vélez-Cruz, R., Iltis, I., Biard, D., Egly, J.M., 2010. NER Factors Are Recruited to Active Promoters and Facilitate Chromatin Modification for Transcription in the Absence of Exogenous Genotoxic Attack. *Mol. Cell* 38, 54–66. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.004
- Le Tallec, B., Millot, G.A., Blin, M.E., Brison, O., Dutrillaux, B., Debatisse, M., 2013. Common

fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. *Cell Rep.* 4, 420–428.
doi:10.1016/j.celrep.2013.07.003

- Li, J., Wang, Q.-E., Zhu, Q., El-Mahdy, M.A., Wani, G., Prætorius-Ibba, M., Wani, A.A., 2006. DNA Damage Binding Protein Component DDB1 Participates in Nucleotide Excision Repair through DDB2 DNA-binding and Cullin 4A Ubiquitin Ligase Activity. *Cancer Res.* 66, 8590–8597. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1115
- Lindenbaum, Y., Dickson, D., Rosenbaum, P., Kraemer, K., Robbins, I., Rapin, I., 2001. Xeroderma pigmentosum/cockayne syndrome complex: first neuropathological study and review of eight other cases. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.* 5, 225–242. doi:10.1053/ejpn.2001.0523
- Miotto, B., Chibi, M., Xie, P., Koundrioukoff, S., Moolman-Smook, H., Pugh, D., Debatisse, M., He, F., Zhang, L., Defossez, P.-A., 2014. The RBBP6/ZBTB38/MCM10 Axis Regulates DNA Replication and Common Fragile Site Stability. *Cell Rep.* 7, 575–587.
doi:10.1016/j.celrep.2014.03.030
- Nance, M.A., Berry, S.A., 1992. Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am. J. Med. Genet.* 42, 68–84. doi:10.1002/ajmg.1320420115
- Nospikel, T., 2009. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 994–1009. doi:10.1007/s00018-009-8737-y
- Oksenysh, V., Coin, F., 2010. The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 90–96.
- Panier, S., Boulton, S.J., 2014. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 7–18. doi:10.1038/nrm3719
- Pourquier, P., 2006. La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie. *Bull. Cancer (Paris)* 93, 124–144.
- Rapin, I., Lindenbaum, Y., Dickson, D.W., Kraemer, K.H., Robbins, J.H., 2000. Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology* 55, 1442–1449.
- Reardon, J.T., Sancar, A., 2003. Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. *Genes Dev.* 17, 2539–2551. doi:10.1101/gad.1131003
- Riedl, T., Hanaoka, F., Egly, J.-M., 2003. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J.* 22, 5293–5303. doi:10.1093/emboj/cdg489
- Sasai, N., Nakao, M., Defossez, P.-A., 2010. Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.* 38, 5015–5022. doi:10.1093/nar/gkq280
- Soutoglou, E., Misteli, T., 2008. Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science* 320, 1507–1510. doi:10.1126/science.1159051
- Sugasawa, K., 2008. XPC: its product and biological roles. *Adv. Exp. Med. Biol.* 637, 47–56.
- Sugasawa, K., 2011. Multiple DNA damage recognition factors involved in mammalian nucleotide excision repair. *Biochem. Mosc.* 76, 16–23. doi:10.1134/S0006297911010044
- Svejstrup, J.Q., 2002. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 21–29. doi:10.1038/nrm703
- Theil, A.F., Nonnekens, J., Steurer, B., Mari, P.-O., de Wit, J., Lemaitre, C., Marteiijn, J.A., Raams, A., Maas, A., Vermeij, M., Essers, J., Hoeijmakers, J.H.J., Giglia-Mari, G., Vermeulen, W., 2013. Disruption of TTDA Results in Complete Nucleotide Excision Repair Deficiency and Embryonic Lethality. *PLoS Genet* 9, e1003431.
doi:10.1371/journal.pgen.1003431

- Theil, A.F., Nonnekens, J., Wijgers, N., Vermeulen, W., Giglia-Mari, G., 2011. Slowly Progressing Nucleotide Excision Repair in Trichothiodystrophy Group A Patient Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3630–3638. doi:10.1128/MCB.01462-10
- Tornaletti, S., Hanawalt, P.C., 1999. Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* 81, 139–146.
- Uchida, A., Sugasawa, K., Masutani, C., Dohmae, N., Araki, M., Yokoi, M., Ohkuma, Y., Hanaoka, F., 2002. The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH. *DNA Repair* 1, 449–461. doi:10.1016/S1568-7864(02)00031-9
- Venema, J., van Hoffen, A., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H., 1990. The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA. *Nucleic Acids Res.* 18, 443–448.
- Vermeulen, W., Bergmann, E., Auriol, J., Rademakers, S., Frit, P., Appeldoorn, E., Hoeijmakers, J.H.J., Egly, J.-M., 2000. Sublimiting concentration of TFIIH transcription/DNA repair factor causes TTD-A trichothiodystrophy disorder. *Nat. Genet.* 26, 307–313. doi:10.1038/81603
- Vitorino, M., Coin, F., Zlobinskaya, O., Atkinson, R.A., Moras, D., Egly, J.-M., Poterszman, A., Kieffer, B., 2007a. Solution Structure and Self-association Properties of the p8 TFIIH Subunit Responsible for Trichothiodystrophy. *J. Mol. Biol.* 368, 473–480. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.020
- Vitorino, M., Coin, F., Zlobinskaya, O., Atkinson, R.A., Moras, D., Egly, J.-M., Poterszman, A., Kieffer, B., 2007b. Solution structure and self-association properties of the p8 TFIIH subunit responsible for trichothiodystrophy. *J. Mol. Biol.* 368, 473–480. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.020
- Wang, Y., Wang, Z., Teng, Y., Shi, J., Wang, H., Yuan, W., Chu, X., Wang, D., Wang, W., Huang, W., 2013. An SNP of the ZBTB38 gene is associated with idiopathic short stature in the Chinese Han population. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 79, 402–408. doi:10.1111/cen.12145
- Winkler, G.S., Araújo, S.J., Fiedler, U., Vermeulen, W., Coin, F., Egly, J.M., Hoeijmakers, J.H., Wood, R.D., Timmers, H.T., Weeda, G., 2000. TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA repair. *J. Biol. Chem.* 275, 4258–4266.
- Wittschieben, B.Ø., Iwai, S., Wood, R.D., 2005. DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. *J. Biol. Chem.* 280, 39982–39989. doi:10.1074/jbc.M507854200
- Xiao, X., Melton, D.W., Gourley, C., 2014. Mismatch repair deficiency in ovarian cancer — Molecular characteristics and clinical implications. *Gynecol. Oncol.* 132, 506–512. doi:10.1016/j.ygyno.2013.12.003
- Yokoi, M., Masutani, C., Maekawa, T., Sugasawa, K., Ohkuma, Y., Hanaoka, F., 2000. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. *J. Biol. Chem.* 275, 9870–9875.
- You, J.-S., Wang, M., Lee, S.-H., 2003. Biochemical Analysis of the Damage Recognition Process in Nucleotide Excision Repair. *J. Biol. Chem.* 278, 7476–7485. doi:10.1074/jbc.M210603200

Etude du complexe de réparation par excision de nucléotides

Résumé

Résumé:

Mon travail de thèse s'est axé sur deux projets, le premier a porté sur l'étude fonctionnelle de la sous unité TTDA de TFIIH, un facteur général de transcription impliqué dans la réparation NER, afin d'identifier de nouveaux partenaires de la sous unité TTDA nous avons réalisé un crible double hybride et ainsi sélectionné ZBTB38, une protéine impliquée dans la répression de gènes portant des méthylations CpG, nous avons confirmé son interaction avec TTDA, et son implication dans la réparation NER. La deuxième partie a porté sur l'étude du recrutement des facteurs NER sur la chromatine en absence de lésions de l'ADN. En utilisant le système rapporteur LacO/LacR nous avons observé que l'immobilisation de l'un des facteurs NER sur la chromatine non endommagée permet l'assemblage du PInC de façon séquentielle et ordonnée. Nous avons aussi révélé que TTDA, connue pour être impliquée dans la trichothiodystrophie, joue un rôle clé dans la complétion du PInC.

Mots clés : NER, TFIIH, TTDA, ZBTB38, PInC.

Résumé en anglais

During my thesis I worked on two projects, the first one was focused on the functional study of TTDA subunit of TFIIH, which is a general transcription factor involved in NER, we made a double hybrid screening to identify new interactants of TTDA subunit, and we could select ZBTB38, which is known to be implicated in methyl dependant gene repression; we confirmed its interaction with TTDA and its involvement in NER. The second project was entitiled Molecular Insights into the formation of the nucleotide excision repair complex revealed on undamaged chromatin. we analyzed the formation of the PInC independently of DNA damage by using the LacO-LacR system. We observed a sequential and ordered self-assembly of the PInC operating upon immobilization of individual NER factors on undamaged chromatin and mimicking that functioning on a *bona fide* NER substrate. We also revealed that the recruitment of TTDA, involved in Trichothiodystrophy disorder, was key in the completion of the PInC.

Key words : NER, TFIIH, TTDA, ZBTB38, PInC