



Dynamique des variants de l'histone H3 en réponse aux dommages de l'ADN induits par les UVC dans les cellules humaines

Salomé Adam

► **To cite this version:**

Salomé Adam. Dynamique des variants de l'histone H3 en réponse aux dommages de l'ADN induits par les UVC dans les cellules humaines. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. <NNT : 2015PA066288>. <tel-01332477>

HAL Id: tel-01332477

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01332477>

Submitted on 16 Jun 2016

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale : Complexité du Vivant (ED515)

Laboratoire Dynamique du Noyau (UMR3664) / Equipe Dynamique de la Chromatine
Laboratoire Epigénétique et Destin Cellulaire (UMR7216) / Equipe Intégrité de l'Epigénome

Dynamique des variants de l'histone H3 en réponse aux dommages de l'ADN induits par les UVC dans les cellules humaines

Par Salomé ADAM

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire

Dirigée par Dr. Geneviève ALMOUZNI et Dr. Sophie POLO

Présentée et soutenue publiquement le 15 juin 2015

Devant un jury composé de :

- Pr. Michelle DEBATISSE, PR1, Présidente du jury
- Dr. Geneviève ALMOUZNI, DRCE, Directrice de thèse
- Dr. Sophie POLO, CR2, Directrice de thèse
- Dr. Saadi KHOCHBIN, DRCE, Rapporteur
- Dr. Gaëlle LEGUBE, CR1, Rapporteur
- Pr. Vincent DION, SNF Professeur, Examineur
- Dr. Ambra GIGLIA-MARI, CR1, Examinatrice

« On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ;

On ne voit que ce qui reste à faire. »

Marie Curie

« Ce n'est qu'en essayant continuellement que l'on finit par réussir.

Autrement dit : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche. »

Jacques Rouxel (Les Shadoks)

REMERCIEMENTS

A l'heure de clôturer mon manuscrit de thèse, les lignes qui vont suivre vont finalement être les plus dures à écrire, car j'espère que je n'oublierai personne... Je tiens donc à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont partagé mon quotidien au cours de ces quatre dernières années et qui ont fait de cette thèse une histoire humaine enrichissante et inoubliable.

Je souhaite tout d'abord remercier mes deux co-directrices de thèse, *Sophie* et *Geneviève*, pour avoir acceptée de forger mon esprit scientifique et de m'avoir proposée un sujet de recherche aussi passionnant. Ces quelques lignes ne suffiront sûrement pas pour vous remercier de tout ce que vous m'avez appris. *Geneviève*, je te remercie pour tous les échanges constructifs que nous avons eus malgré ton emploi du temps chargé. Je te suis également reconnaissante de l'opportunité que tu m'as donnée, avec *Nathalie*, de participer à l'organisation du cours international d'Épigénétique de l'Institut Curie trois années de suite. *Sophie*, étant la première doctorante que tu as encadrée, nous avons vécu toutes les deux une expérience unique : un grand merci pour ta patience inébranlable, ta disponibilité constante, ton sens aigu de l'organisation (mon déménagement a été si bien orchestré !), tes conseils avisés, ton soutien et ta confiance sans faille (surtout dans les périodes de doute) et pour avoir orienté mes idées, même les plus farfelues, tout au long de ces quatre dernières années !

Je remercie également mes rapporteurs *Saadi Khochbin* et *Gaëlle Legube*, ainsi que *Michelle Debatisse*, *Vincent Dion* et *Ambra Giglia-Mari* pour avoir gentiment accepté d'évaluer mon travail de thèse. J'adresse aussi mes sincères remerciements à mon comité de thèse pour les précieux conseils apportés lors de nos réunions annuelles : les chefs d'équipe de l'UMR3664, *Angela Taddei*, *Nathalie Dostatni*, *Valérie Borde* et *Manolis Papamichos-Chronakis* ainsi que mes tuteurs *Sébastien Bloyer* et *Anne Peyroche*. Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier, entre autres, de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan et de la Ligue contre le cancer, et je leur en suis donc reconnaissante. Spéciale dédicace aux deux Oliviers – *Olivier Renaud* et *Olivier Leroy* – mes collaborateurs de la plateforme d'imagerie de l'Institut Curie. Merci pour toutes les heures passées dans l'obscurité, devant le microscope confocal, pour mettre au point et trouver des solutions aux multiples soucis techniques liés à l'utilisation de la micro-irradiation laser UVC, sans vous, je n'aurais pas obtenu de si magnifiques films de cellules vivantes !

Je tiens aussi à remercier, tous les membres passés et présents de l'UMR3664 et de l'UMR7216 pour l'environnement scientifique et humain remarquable dont j'ai eu la chance de bénéficier, vous êtes si nombreux que je ne peux malheureusement pas tous vous citer ici. Merci à *Dominique*, *Marion*, *Geneviève*, *Xavier* et *Ingrid* pour leur soutien administratif

permanent et à *Anifa, Martine, Eric* et *Myriam* pour leur aide technique inestimable. Coup de chapeau à tous mes voisins de bureau et/ou de paillasse qui ont dû me supporter à un moment ou un autre de mes quatre années de thèse. *Adam* et *Gaston*, mes tout premiers voisins dans notre petit laboratoire du Pavillon Pasteur, je vous remercie chaleureusement pour tous vos conseils techniques et scientifiques. *Gaston*, tu sais que ta bonne humeur et ton enthousiasme quotidiens me manquent terriblement ! *Kelly*, merci pour tous les déjeuners que nous avons partagés et d'avoir été à l'écoute dans les moments les plus difficiles. *Laura*, nous avons occupé le même laboratoire que pendant quelques mois, mais je tiens à te remercier de m'avoir soutenue dans la période de transition qui a précédé mon déménagement.

Je remercie *Jonathan Weitzman, Valérie Mezger, Slimane Ait-Si-Ali, Pierre-Antoine Defossez, Claire Rougeulle, Claire Francastel, Jan Sap* et *Bertrand Cosson* pour votre accueil chaleureux au sein de l'UMR7216 et en particulier l'équipe de *Claire Rougeulle*, pour nous avoir accueilli dans leur laboratoire en attendant la fin des travaux de la pièce que nous occupons maintenant. Mention spéciale à *Mélanie* pour ta franchise et pour toutes les opportunités que nous avons eu de discuter de tout et de rien. Un grand merci aussi à *Sabrina*, qui fut un temps ma binôme de pièce de culture, tu as réussi à me remonter le moral de nombreuses fois. Je suis sûre que tu vas passer ta thèse avec brio ! J'ai eu le privilège de voir l'équipe de *Sophie* s'agrandir au fur et à mesure, je vous remercie donc tous d'avoir contribué, chacun à votre manière, à ce travail de thèse. *Siau*, tu n'es pas restée très longtemps au sein du laboratoire mais je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour avoir organisé parfaitement mon déménagement avec *Sophie* et pour m'avoir épaulée durant les premiers mois d'existence de l'équipe. *Juliette*, tu as été la première étudiante que j'ai encadrée et je suis fière de tout le chemin que nous avons parcouru ensemble : un grand merci pour ton travail immense, ta bonne humeur permanente, pour avoir toujours vu le bon côté des choses même lorsque les manips ne fonctionnaient pas. Je te souhaite de continuer ta thèse aussi brillamment que tu l'as commencée ! *Odile*, ta patience, ton calme, tes conseils, tes mains « magiques » (et pas qu'en culture cellulaire) me manqueront ! Je ne sais comment te dire merci de ton aide précieuse qui m'a permise de boucler mes manips. *Florent*, notre « gaffeur » et retardataire invétéré ! Je ne compte plus toutes les discussions et fous-rires que nous avons eus à essayer de comprendre pourquoi ton taux de réussite d'IF et WB était si bas quand tu as débuté dans l'équipe, rien que d'y repenser, ça me fait sourire. Rappelle-toi, être trop minutieux est l'ennemi du bien ! *Anna*, la toute dernière recrue de l'équipe, je te souhaite bonne chance pour ton M2 puis ta thèse !

Enfin, mes derniers remerciements vont à ma famille et mes amis. Mille mercis, donc, car je ne serai pas arrivée jusqu'ici sans votre soutien indéfectible. En particulier, je réserve mes plus profonds remerciements à mes parents car tout au long de mon cursus, vous m'avez toujours aidé et encouragé, me donnant ainsi toutes les chances de réussir.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACF : ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor	E2F1 : E2F Transcription Factor 1
ALC1 : Amplified in Live Cancer 1	EdU : Ethynyl 2' deoxyUridine
ALT : Alternative Lengthening of Telomeres	EJ : Jonction des Extrémités
PRC2 : Polycomb Group Repressive Complex 2	ELL : Eleven–nineteen Lysine-rich Leukemia
ANP32E : Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 kilodalton E	ERCC : Excision Repair Cross Complementing
AR(D)N : Acide (Desoxy)RiboNucléique	ES : Embryonic Stem
ARNP : ARN Polymérase	EU : Ethynyl-Uridine
ASF1 : Anti Silencing Function 1	FACT : Facilitates Chromatin Transcription
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	FRAP : Fluorescence Recovery After Photo-bleaching
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	FRET : Fluorescent Resonance Energy Transfer
ATPase : Adenosine TriPhosphatase	Gcn5 : General control non-derepressible 5
ATR : Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3-related	GFP : Green Fluorescent Protein
ATRX : α -Thalassemia/mental Retardation X-linked	GG-NER : NER Génomique Globale
BER : Excision de Base	HAT : Histone Acétyl Transférase
BRG1 : Brahma-Related Gene 1	HDAC : Histone Dé-Acétyl Transférase
BRM : Brahma	HDMT : Histone Dé-Méthyl Transférase
BRWD3 : Bromodomain and WD repeat Domain containin 3	Hip : HIRA interacting protein
CABIN1 : Calcineurin Binding Protein 1	Hir : Histone regulation
CAF-1 : Chromatin Assembly Factor 1	HIRA : Histone Regulator A
CBP : CREB binding protein	HJURP : Holliday Junction Recognition Protein
CENP-A : Centromere Protein A	HMG : High Mobility Group
CETN : Centrin	HMGN1 : High Mobility Group Nucleosome binding domain 1
CHD : Chromodomain Helicase DNA binding protein,	HMT : Histone Méthyl Transférase
Chk1 : Checkpoint kinase 1	HP1 : Heterochromatin Protein 1
COFS : Syndrome cérébro-oculo-facio squelettique	Hpc2 : Histone periodic control 2
RPB1 : RNA Pol II subunit 1	HR : Recombinaison Homologue
CPD : Dimères de Pyrimidine de type Cyclobutane	HR23 : Homolog of Rad23
CS : Cockayne Syndrome	ING : Inhibitor of Growth family
CUL : Cullin	INO80 : Inositol requiring 80
DAXX : Death Domain–Associated protein	ISWI : Imitation Switch
DDB : DNA Binding Protein	kb : kilobase
DEK : Drosophila Eph Kinase homolog	KDa : KiloDalton
DNase I : DNA Nuclease I	MCM2 : minichromosome maintenance complex component 2
DOT1L : Disruptor of Telomeric silencing-1 like	MDC1 : Mediator of DNA Damage Checkpoint 1
DRB : 5,6-dichlorobenzimidazole 1-b-D-ribofuranoside	me : méthylation
DUB : Dé-Ubiquitylase	MMR : Réparation des Mésappariements
	MMS : methyl methanesulfonate
	MNase : Micrococcal Nuclease
	MSCI : Inactivation Méiotique des Chromosomes Sexuels

NAP : Nucleosome Assembly Protein
NPM1 : Nucleophosmin 1
NASP : Nuclear Autoantigenic Sperm Protein
NER : Excision de Nucléotides
nm : nanomètre
NuRD : Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation
Oreg : Oregon green
PA-GFP : Photo-Activable Green Fluorescent Protein
par : poly-ADP ribosylation
PARP1 : Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
pb : paire de bases
PCAF : P300/CBP-Associated Factor
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
ph : phosphorylation
PML : Promyelocytic Leukemia
PP1 γ : Protein Phosphatase 1 γ
RBX1 : RING Box 1
RFC : Replication Factor C
RPA : Replication Protein A
RNF2 : Ring Finger Protein 2
shARN : short hairpin ARN
SILAC : Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture
SIRT1 : Sirtuin 1
SLBP : Stem-Loop Binding Protein
Slm9 : Synthetic lethal mutant 9
SMARCA5 : SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily A, member 5
snRNP : U7 small nuclear ribonucleoprotein
Spt 16 : Suppressor of Ty 16 homolog,
SRCAP : SWI2/SNF2-related CBP Activator Protein
SUMO : Small Ubiquitin-related Modifier

Suv4-20h : Suppressor of variegation 4-20 homolog
SWI/SNF : Switch/Sucrose Non Fermentable
TC-NER : NER Couplé à la Transcription
TERRA : telomere-repeat-encoding RNA
TFIIH : Transcription Factor IIH
TIP60 : Tat-Interacting Protein 60
TLK1B : Tousled Like Kinase 1B
TLS : Synthèse Translésionnelle
TMR : Tétra-Méthyl-Rhodamine
TopBP : Topoisomerase II Binding Protein
TSA : Trichostatine A
TTD : TrichoThioDystrophy
ub : Ubiquitylation
UBN : Ubinuclein
USP : Ubiquitin Specific Processing protease
UV : Ultraviolet
UV-DDB : UltraViolet - DNA Damage Binding complex
UVSS : UV Stimulated Scaffold protein
WHSC1 : Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1
WICH : Williams syndrome transcription factor - ISWI Chromatin remodeling complex
XAB2 : XPA Binding protein 2
XIST : X-inactive-specific-transcript
XNP : X-linked nuclear protein
XP : Xeroderma Pigmentosum
XRCC : X ray Repair Cross Complementing
YEM : Yemanuclein
ZMNYND11 : Zinc finger MYND-type containing 11
 μm : micromètre

Espèces :

A. thaliana : *Arabidopsis thaliana*
D. melanogaster : *Drosophila melanogaster*
G. gallus : *Gallus gallus*
H. sapiens : *Homo sapiens*
M. musculus : *Mus musculus*
S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*
S. pombe : *Schizosaccharomyces pombe*
X. laevis : *Xenopus laevis*

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
SOMMAIRE.....	6
PREAMBULE.....	9
INTRODUCTION.....	12
1. Réponses cellulaires aux lésions de l'ADN induites par les rayons UVC.....	13
1.1. Dommages à l'ADN générés par les UVC.....	14
1.2. Réparation des dommages induits par les UVC.....	16
1.2.1. Réparation génomique globale (GG-NER).....	17
1.2.2. Réparation couplée à la transcription (TC-NER).....	19
1.2.3. Pathologies associées.....	20
1.3. Autres réponses cellulaires induites par les UVC : zoom sur la régulation de l'activité transcriptionnelle des cellules.....	21
1.3.1. Mécanismes d'inhibition de la transcription.....	22
1.3.2. Mécanismes de reprise de la transcription.....	22
2. Organisation de l'ADN en chromatine.....	25
2.1 La chromatine : structure de base.....	25
2.1.1. Historique.....	25
2.1.2. Le nucléosome : unité fondamentale de la chromatine.....	26
2.1.3. Niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine.....	28
2.2. La chromatine : structure modulable porteuse de l'information épigénétique.....	30
2.2.1. Régulation du niveau de compaction et remodelage de la chromatine.....	30
2.2.2. Modifications chimiques de l'ADN et des histones.....	31
2.2.3. Incorporation de variants d'histones.....	34
2.3. Le variant H3.3 : un variant d'histone aux multi-facettes.....	36
2.3.1. Caractéristiques structurales de H3.3.....	36
2.3.2. Incorporation de H3.3 par des chaperons d'histones spécifiques.....	39
2.3.3. Importance fonctionnelle de H3.3 et de ses chaperons associés.....	44
2.3.4. Mutations ponctuelles de H3.3 et leur potentiel oncogénique.....	49
3. Dynamique de la chromatine en réponse aux dommages induits par les UVC.....	52
3.1. Réarrangements de la chromatine en réponse aux UVC : modèle « Accessibilité-Réparation-Restitution ».....	52
3.2. Modifications post-traductionnelles des histones induites par les UVC.....	54
3.2.1. Acétylation des histones.....	54
3.2.2. Ubiquitylation des histones.....	56
3.2.3. Autres modifications des histones.....	58
3.3. Mobilisation d'histones au sein de la chromatine endommagée par les UVC.....	59
3.3.1. Perte de densité d'histones incorporées & remodelage précoce de la chromatine.....	61
3.3.2. Echange accéléré d'histones.....	63
3.3.3. Incorporation d'histones.....	64
3.4. Dynamique de la chromatine endommagée par les UVC et régulation de son activité transcriptionnelle.....	66
3.4.1. Plasticité de la chromatine associée à l'inhibition de la transcription.....	66
3.4.2. Plasticité de la chromatine associée à la reprise de la transcription ou au TC-NER.....	68
PROBLEMATIQUE.....	72
1. Questions et méthodologies.....	73
2. Objectifs de la thèse.....	75

RESULTATS	78
1. Mise en place précoce de nouvelles histones H3.3 par le complexe chaperon HIRA dans les régions de chromatine endommagées par les UVC	79
1.1. Dynamique des variants de l’histone H3 néo-synthétisés aux sites de lésions induites par les UVC.....	79
1.2. Aspects mécanistiques	79
1.3. Discussion : comment HIRA est-il recruté aux sites de dommages ?	81
2. Importance de la voie HIRA pour la reprise de la transcription après réparation des dommages générés par les UVC	83
2.1. Réparation des dommages induits par les UVC en l’absence de HIRA	83
2.2. Marquage par HIRA de la chromatine endommagée qui la rend apte à reprendre la transcription	84
2.3. Discussion : quelle est l’importance fonctionnelle de HIRA en réponse aux dommages de l’ADN ?.....	85
Article scientifique n°1	87
3. Redistribution conservatrice des histones H3 parentales couplée à la détection des dommages UVC.....	111
3.1. Dynamique à court terme des variants parentaux de l’histone H3 aux sites de dommages induits par les UVC	111
3.2. Aspects mécanistiques	113
3.3. Discussion : comment DDB2 favorise-t-il la redistribution spatiale des histones parentales ?.....	114
4. Retour d’histones H3 parentales couplé à la réparation des lésions induites par les UVC	116
4.1. Dynamique à long terme des histones H3.3 parentales et néo-synthétisées aux sites de dommages induits par les UVC	116
4.2. Aspects mécanistiques	116
4.3. Discussion : y-a-t-il un recyclage des histones parentales « mobilisées » ?.....	117
Article scientifique n°2	118
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	156
1. Apport des résultats au modèle « Accessibilité-Réparation-Restitution ».....	157
2. Perspectives.....	160
2.1. Paramètres pouvant contrôler la dynamique des histones en réponse aux dommages de l’ADN	160
2.1.1. <i>Type de dommages de l’ADN et de voies de réparation</i>	160
2.1.2. <i>Cycle cellulaire</i>	162
2.1.3. <i>Organisation et état transcriptionnel de la chromatine</i>	162
2.1.4. <i>Type cellulaire et état de différenciation</i>	163
2.2. Impact de la dynamique des histones en réponse aux lésions de l’ADN sur le maintien de l’information épigénétique	164
2.3. Pathologies & cancers : dysfonctionnement de la dynamique des histones après stress génotoxique ?.....	167
2.3.1. <i>Cas des pathologies associées à un défaut de la réponse aux UVC</i>	167
2.3.2. <i>Cas des cancers associés à des mutations des histones H3</i>	167
BIBLIOGRAPHIE.....	169
ANNEXES	200
Annexe 1 : Dynamique de la chromatine, dommages de l’ADN et régulation de la transcription	201
Annexe 2 : Chaperons d’histones H3 et restitution de l’organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine.....	208

Annexe 3 : Dynamique de la chromatine associée à la réparation des dommages par excision de nucléotides.....	218
Annexe 4 : Perspectives ouvertes par les recherches actuelles sur la dynamique dommages-induite des histones	236
Annexe 5 : Suivre la dynamique d'histones néo-synthétisées dans la chromatine lésée aux UVC	244
TABLE DES ILLUSTRATIONS	256
TABLE DES TABLEAUX.....	257
LISTE DES PUBLICATIONS	258

PREAMBULE

Qu'est-ce que l'épigénétique ?

Le terme épigénétique a été introduit historiquement par le biologiste britannique Conrad Waddington dans les années 1940 (Waddington, 1942). Il est issu de la notion d'épigénèse proposée par Aristote, notion dans laquelle les organismes se construisent progressivement au cours du développement embryonnaire à partir de l'informe. L'épigénétique désignait alors « la branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, faisant apparaître le phénotype » et avait comme objectif principal d'expliquer les « insuffisances » de la génétique. En effet, comment à partir d'une seule et unique information génétique, est-il possible de construire un organisme entier composé de cellules spécialisées toutes différentes ? Selon Waddington, les gènes définissent en fait un « paysage épigénétique », dans lequel chaque cellule de l'organisme, au cours de leur différenciation, s'engage irréversiblement sur un chemin particulier, telle une rivière qui coule le long d'une vallée (Waddington, 1957). Chaque cellule exprime donc de manière différentielle les gènes qu'elle possède et acquiert de cette façon sa propre identité qu'elle maintient au cours des divisions cellulaires.

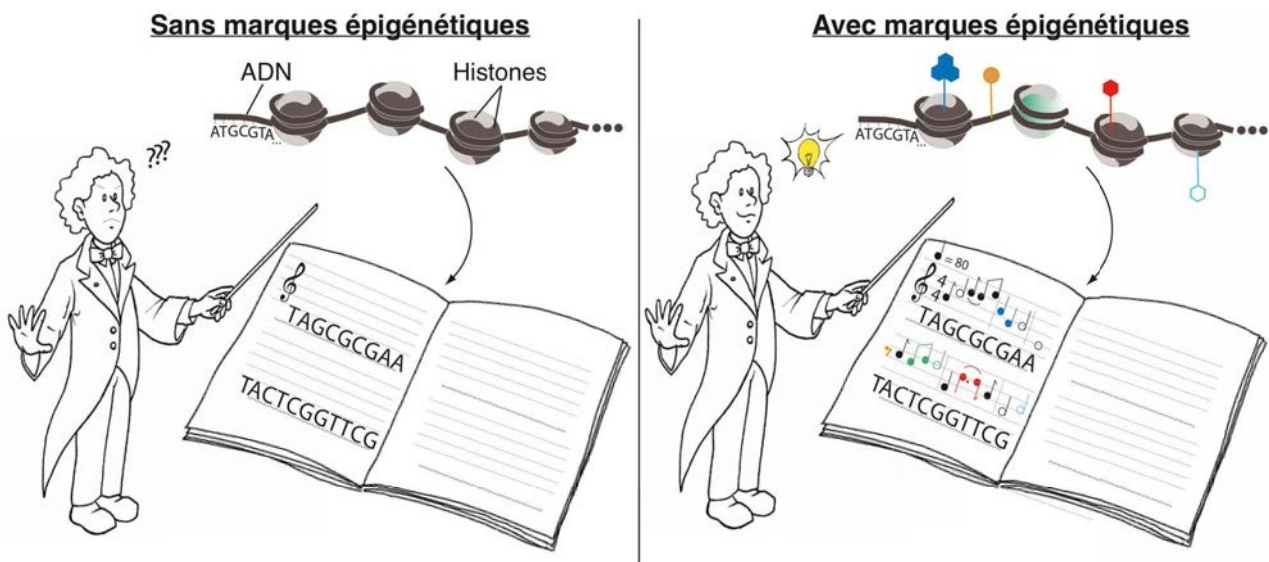


Figure 1 : Qu'est-ce que l'épigénétique: une interprétation par la cellule de sa partition génétique. Dans cette vision de l'épigénétique, chacune des bases de l'ADN correspond à une note de musique. L'association de l'ADN avec des protéines histones au sein de la chromatine forme la base de l'information épigénétique. Cette dernière apporte des nuances et des altérations particulières qui permettent à chaque cellule de notre organisme (le chef d'orchestre) de créer sa propre symphonie à partir d'une partition génétique commune. Auteurs de l'illustration : Kelly Roméo, Salomé Adam et Zachary Gurard-Levin.

La définition de l'épigénétique commence à évoluer à partir des années 1970, lorsque les mécanismes moléculaires régulant l'expression génique et la transmission des caractères phénotypiques de génération en génération sont de mieux en mieux compris. Il s'agit alors du contrôle de l'activité des gènes par méthylation de l'ADN (Holliday, 1987), puis par toute autre modification des composantes de la chromatine, complexe d'ADN et de protéines

(Kornberg, 1977). La chromatine est donc le support de l'information génétique et d'une information supplémentaire qualifiée d'épigénétique. Cette dernière est définie actuellement comme une information non codée par la séquence d'ADN, héritable au cours des divisions cellulaires mais potentiellement réversible, qui assure une régulation fine de l'expression des gènes (Russo et al., 1996). On peut ainsi considérer que l'information épigénétique détermine comment la partition génétique doit être lue. Chaque cellule de l'organisme, en réalisant une lecture particulière de son ADN grâce à son information épigénétique, forge sa propre symphonie, c'est-à-dire sa propre identité cellulaire (**Figure 1**).

Cependant, les cellules sont quotidiennement exposées à des agents génotoxiques, qui sont susceptibles de produire près d'un million de dommages dans l'ADN chaque jour (Ciccia and Elledge, 2010). Ces lésions mettent en péril le maintien de l'intégrité des informations génétiques et épigénétiques. Alors que les mécanismes assurant la préservation de la séquence d'ADN ont depuis longtemps attiré l'attention de la communauté internationale, ce n'est que depuis quelques décennies que les chercheurs s'intéressent à la réparation des dommages de l'ADN dans le contexte de la chromatine.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai donc décidé d'aborder l'importante **question du maintien de l'architecture de la chromatine, et des informations qu'elle véhicule, lors d'un stress génotoxique**. Pour cela, j'ai analysé la dynamique d'une des composantes de la chromatine, l'histone H3, en réponse à une irradiation aux UV dans des cellules humaines en culture et j'ai essayé de comprendre comment l'intégrité structurale et fonctionnelle de la chromatine est conservée après dommages de l'ADN induits par les UV. Ainsi, dans une première partie introductive, je vous illustrerai notre compréhension actuelle, d'une part des réponses cellulaires enclenchées par une irradiation aux UV et d'autre part, de la dynamique de la chromatine en situation normale ou après stress génotoxique. Dans un deuxième chapitre, je vous détaillerai la problématique centrale de ma thèse, qui est de comprendre comment la cellule parvient à concilier plasticité de la chromatine et maintien de son information épigénétique après induction de dommages de l'ADN. Puis, je vous exposerai les résultats expérimentaux que j'ai obtenus. Je commencerai par des données publiées qui démontrent que le chaperon d'histone HIRA (Histone Regulator A) est un facteur clé de la restitution de la chromatine après irradiation aux UVC, car il permet l'incorporation de nouvelles histones H3.3 aux sites de lésions et la reprise de l'activité transcriptionnelle des cellules irradiées après réparation des dommages. Je vous présenterai ensuite des résultats non publiés sur la dynamique des histones H3 préexistantes, qui sont redistribuées à court terme autour des sites de lésions de l'ADN avant de « revenir » à ces sites de manière couplée à la réparation des dommages. Je discuterai finalement mes résultats à la lumière de nos connaissances, ainsi que les perspectives qui en découlent, en situation normale ou pathologique.

INTRODUCTION

1. Réponses cellulaires aux lésions de l'ADN induites par les rayons UVC

La cellule est constamment soumise à des agents génotoxiques, d'origine aussi bien exogène (comme les rayons UltraViolets et X) qu'endogène (comme les espèces réactives de l'oxygène issues du métabolisme cellulaire). Ces agents sont susceptibles de provoquer des lésions dans la double hélice d'ADN (Hoeijmakers, 2001) qui peuvent non seulement perturber la réplication et la transcription de l'ADN, mais représentent aussi une menace pour le maintien de l'intégrité du génome si elles ne sont pas réparées fidèlement. Ainsi, l'émergence au cours de l'évolution de mécanismes spécifiques de détection, de réparation ou de tolérance des dommages de l'ADN a permis aux organismes de faire face à cette menace (Ciccia and Elledge, 2010; Jackson and Bartek, 2009) (**Figure 2**).

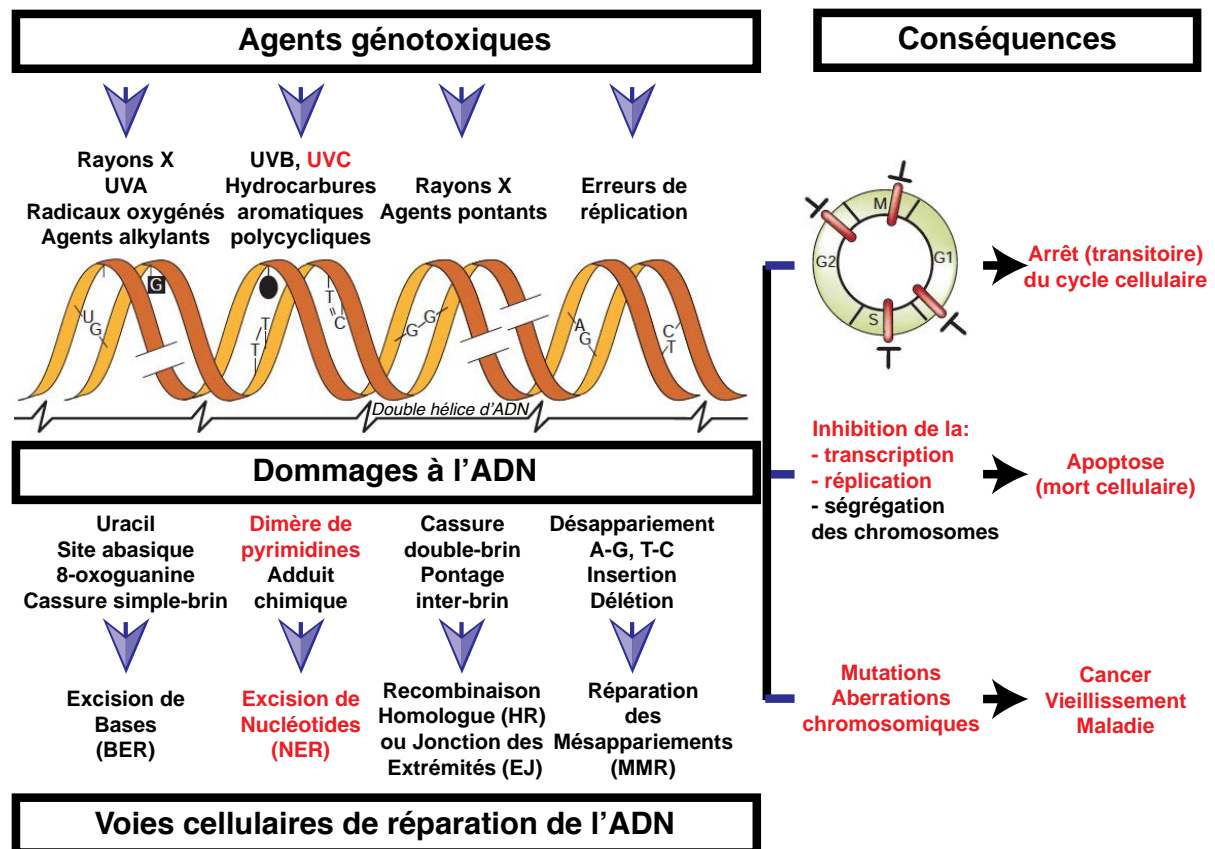


Figure 2 : Nature et conséquences moléculaires des principaux dommages à l'ADN. → indique les points d'inhibition du cycle cellulaire dus à la présence des lésions de l'ADN. La réponse des cellules à une irradiation aux UVC a été surlignée en rouge. Figure adaptée de (Hoeijmakers, 2001).

Au laboratoire, nous avons décidé d'étudier les réponses cellulaires induites par les rayons Ultraviolets C (UVC) car :

– Historiquement, les premières expériences visant à analyser la dynamique de la chromatine après stress génotoxique ont été réalisées après irradiation aux rayons UVC, comme vous pourrez le constater dans la troisième partie de mon manuscrit. Les réponses cellulaires aux lésions générées par les UVC ont été extensivement étudiée dans la littérature (Marteijn et al., 2014) et ses acteurs moléculaires sont maintenant assez bien caractérisés (voir ci-dessous), ce qui en fait un modèle de choix pour l'analyse des réponses aux dommages de l'ADN.

– Bien que l'ozone de l'atmosphère absorbe en totalité les rayons UVC, ces derniers sont classiquement utilisés dans la recherche. En effet, les UVC provoquent les mêmes types de dommages dans l'ADN que les rayons UVB (auxquels l'homme est en partie exposé), tout en étant plus efficaces car leur longueur d'onde (UVC : < 280 nm / UVB : 280-320 nm) sont plus proches du pic d'absorption des bases de l'ADN (260 nm) (Hockberger, 2002). De plus, les longueurs d'onde basses des UVC permettent de combiner facilement techniques d'imagerie sur cellules vivantes et irradiation localisée car contrairement aux autres modes d'irradiation (décrits dans (Dinant et al., 2007)), les UVC n'induisent pas de photo-blanchiment des fluorochromes couramment employés en imagerie.

– Enfin, la responsabilité des rayons UV dans la mutagénèse photo-induite est incontestable, comme le souligne l'existence de pathologies rares dues à des mutations de facteurs clés de réparation (décrites ci-dessous). Mais, il s'agit également d'un véritable problème de santé publique car une exposition prolongée aux rayons UV est reconnue depuis longtemps comme un facteur principal de risque de cancer de la peau (Thaler et al., 2010).

1.1. Dommages à l'ADN générés par les UVC

Lorsque l'ADN est exposé aux UVC, l'énergie absorbée par deux pyrimidines adjacentes portées par le même brin entraîne la formation d'une liaison covalente entre ces deux bases, constituant ainsi un dimère de pyrimidines (Ravanat et al., 2001). Parmi ces dimères, on distingue les « Dimères de Pyrimidine de type Cyclobutane » (CPD) et les photo-produits de type « (6-4) Pyrimidine-Pyrimidone » (6-4PP) (**Figure 3**).

Les CPD et les 6-4PP présentent un profil particulier de distribution dans la chromatine, structure dans laquelle l'ADN est contraint par son enroulement au sein de particules nucléosomales (Richmond and Davey, 2003) (cf. partie 2 pour les détails de

l'organisation de la chromatine). Les CPD se répartissent de façon périodique (environ tous les 10 nucléotides) dans les nucléosomes (Gale et al., 1987; Pehrson, 1995), quel que soit l'état initial de compaction de la chromatine (Gale and Smerdon, 1988). Par contre, bien que présents en quantité équivalente (Mitchell et al., 1990), les CPD sont distribués de manière homogène dans l'ADN reliant les nucléosomes (également appelé ADN lien) (Pehrson, 1995). A l'opposé, les 6-4PP se retrouvent répartis plus uniformément dans les nucléosomes (Gale and Smerdon, 1990), mais avec une concentration environ six fois plus importante dans l'ADN lien (Mitchell et al., 1990). Ces caractéristiques, ainsi que la capacité de distorsion de l'ADN plus grande des lésions 6-4PP (Kim et al., 1995) font que ces derniers sont susceptibles d'être plus aisément reconnus par les machineries de réparation de l'ADN, et donc d'être plus rapidement réparés par rapport aux dommages CPD (Mitchell et al., 1985; Suquet et al., 1995).

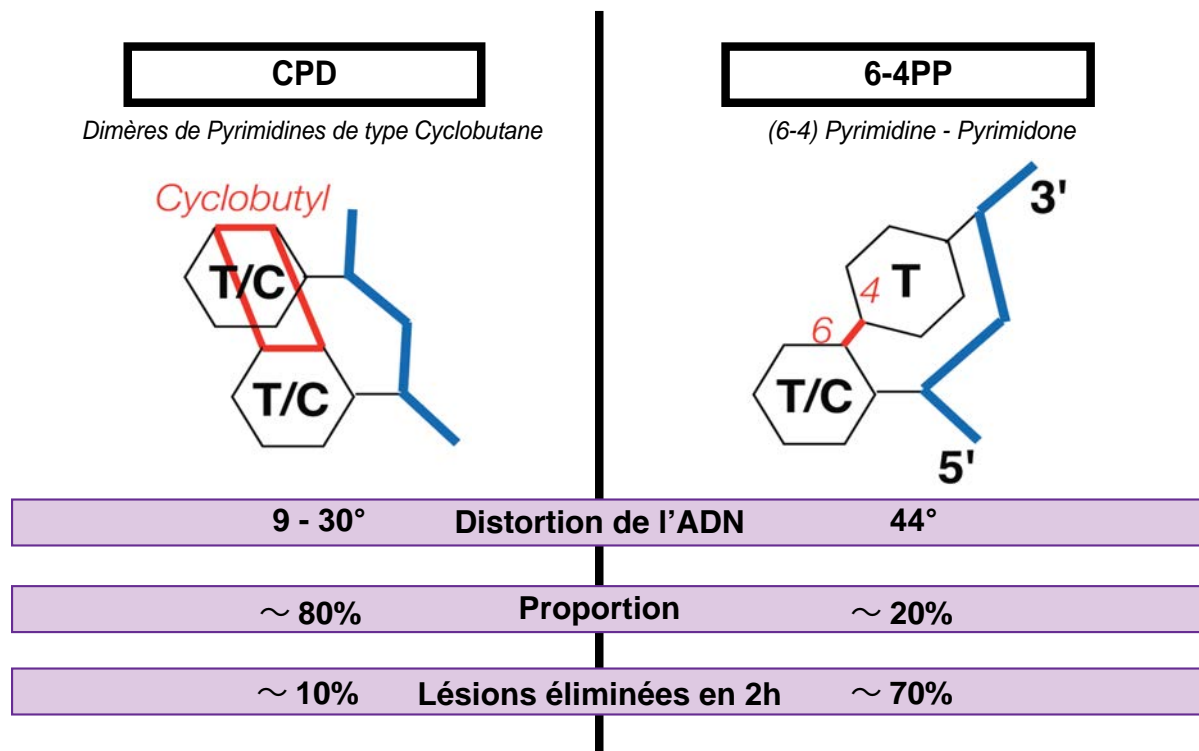


Figure 3 : Les dimères de pyrimidines, dommages à l'ADN majoritairement induits par les UVC. Les CPD et les 6-4PP représentent les deux types de dimères de pyrimidines produits par les UVC. Ils diffèrent par la nature de la liaison covalente (en rouge) reliant les bases pyrimidiques adjacentes (C : cytosine, T : thymidine); par le degré de distorsion de l'ADN généré (données de (Kim et al., 1995; Park et al., 2002)); par leur proportion et leur vitesse d'élimination (données sur cellules humaines de (Mitchell et al., 1985; Suquet et al., 1995)). En bleu est représenté le squelette désoxyribose phosphate de l'ADN.

1.2. Réparation des dommages induits par les UVC

Les dimères de pyrimidines générés par les rayons UVC, comme la plupart des lésions entraînant une distorsion de la double hélice d'ADN, sont réparés de manière fidèle par excision de nucléotides (NER, **Figure 4**) (Alekseev and Coin, 2015; Marteiijn et al., 2014; Nospikel, 2009).

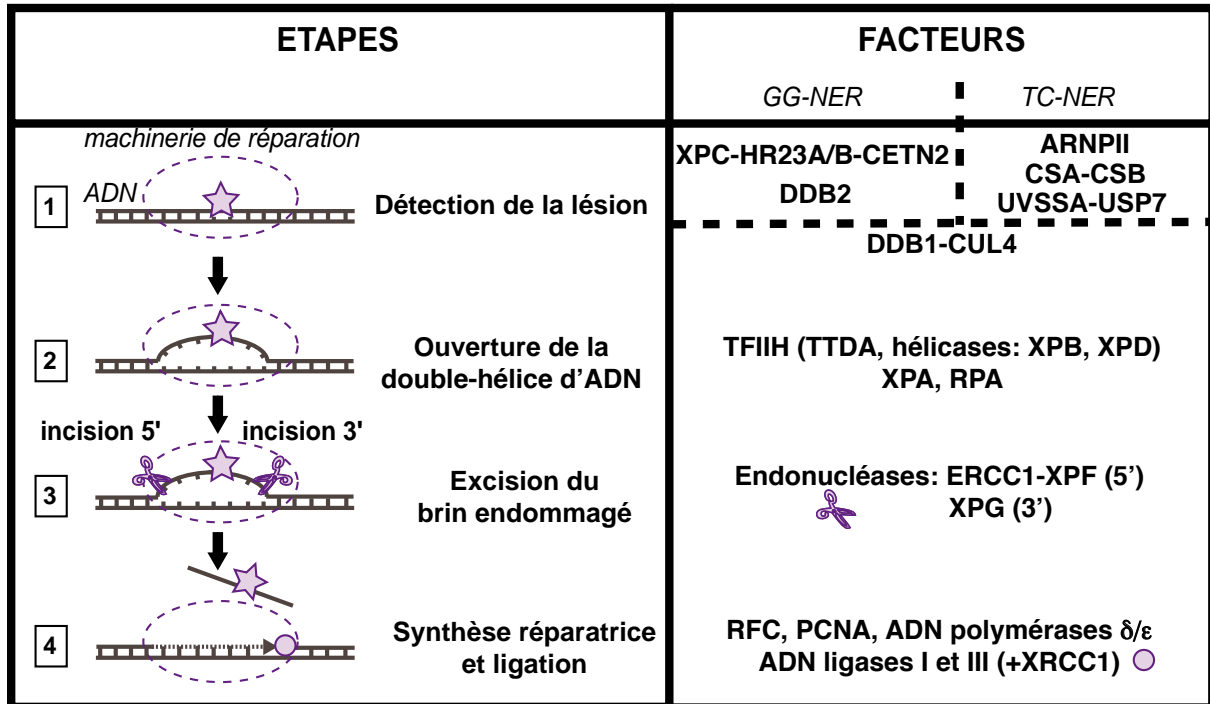


Figure 4 : Réparation par Excision de Nucléotides des lésions de l'ADN générées par les UVC chez l'homme. Les quatre étapes essentielles de la réparation NER ainsi que les facteurs principaux impliqués sont indiqués. La détection des dommages implique deux voies distinctes: Génomique Globale (GG-NER) et Couplée à la transcription (TC-NER) ARNP: ARN Polymérase, CETN: Centrin, CS: Cockayne Syndrome, CUL: Cullin, DDB: DNA Damage Binding, ERCC: Excision Repair Cross Complementing, HR23A/B: Homologs of Rad23 A/B, RFC: Replication Factor C, RPA: Replication Protein A, TFIIH: Transcription Factor IIIH, TTDA : TrichoThioDystrophy A, USP: Ubiquitin Specific Processing protease, UVSSA: UV Stimulated Scaffold protein A, XP: Xeroderma Pigmentosum, XRCC: X ray Repair Cross Complementing. Données tirées des revues (Alekseev and Coin, 2015; Marteiijn et al., 2014; Nospikel, 2009).

Cette voie de réparation, conservée des bactéries à l'homme, se caractérise par l'excision d'un court brin d'ADN contenant le dommage. Chez les mammifères placentaires, tel l'homme, il s'agit du seul mécanisme permettant d'éliminer les dimères de pyrimidines, car ces mammifères ont perdu au cours de l'évolution les gènes codant pour des photolyases, enzymes utilisant l'énergie lumineuse afin de casser la liaison covalente du dimère (Sancar, 2000; Yasui et al., 1994). Les lésions de l'ADN provoquées par les UVC échappant à la réparation et persistant au cours de la réplication de l'ADN, peuvent être « tolérées » grâce à

l'intervention soit de facteurs de recombinaison homologue soit de polymérase spécialisées dans la synthèse translésionnelle (TLS) (cf. revue : (Sale et al., 2012)). En effet, les polymérase répliquatives, du fait de leur haute fidélité, sont incapables de franchir les dommages provoquant des distorsions de l'ADN, ce qui conduit à un arrêt de la réplication. Au contraire, les polymérase impliquées dans la TLS ont un site actif plus flexible, leur permettant de franchir ces lésions mais au risque d'introduire des mutations dans le génome.

La voie NER fait intervenir deux mécanismes de réparation, en fonction de la localisation des dommages au sein du génome. Ainsi, on distingue la réparation génomique globale (GG-NER) et la réparation couplée à la transcription (TC-NER) (cf. revue : (Marteijn et al., 2014)), cette dernière assurant spécifiquement l'élimination des lésions affectant le brin transcrit des gènes transcriptionnellement actifs. Dans les deux cas, la réparation se déroule en quatre étapes principales (décrites avec les facteurs de réparation humains associés en **Figure 4**): (1) détection de la lésion, (2) ouverture locale de la double hélice d'ADN par un complexe hélicase après vérification de la présence du dommage, (3) excision de 25-30 nucléotides du brin endommagé par un couple d'endonucléases, (4) synthèse réparatrice par des ADN polymérase utilisant le brin d'ADN complémentaire non lésé comme matrice, suivie de la ligation. Les voies GG-NER et TC-NER ne diffèrent que par les facteurs impliqués dans la première étape (**Figure 5**). Je vais maintenant vous détailler ces premières étapes, telles qu'elles sont connues chez l'homme.

1.2.1. Réparation génomique globale (GG-NER)

Dans la voie GG-NER, deux complexes protéiques permettent la reconnaissance des lésions induisant une distorsion de l'ADN, quelle que soit leur localisation dans le génome.

D'une part, XPC (Xeroderma Pigmentosum C), associée aux protéines HR23 (Homolog of Rad23) (Masutani et al., 1994) et CETN2 (centrin 2) (Araki et al., 2001), est l'un des principaux facteurs initiateurs de la voie GG-NER puisque son recrutement aux sites de dommages à l'ADN est requis pour l'accumulation des facteurs plus tardifs de la réparation NER (Riedl et al., 2003; Sugasawa et al., 1998; Volker et al., 2001) (**Figure 5**). HR23 et CETN2 stimulent la reconnaissance des dommages par XPC mais les mécanismes sous-jacents restent encore largement sous-explorés (Bergink et al., 2012; Ng et al., 2003; Nishi et al., 2005; Okuda et al., 2004). XPC permet la détection d'un large éventail de dommages (Kusumoto et al., 2001). Des analyses *in vitro* complémentaires ont démontré que XPC ne reconnaît pas directement les dommages, mais l'ADN mal-apparié (Sugasawa et al., 2001). Ces résultats ont été ensuite confirmés grâce à l'obtention de la structure cristallographique de Rad4 (orthologue de XPC chez la levure) associée à une molécule d'ADN contenant un dommage CPD. En effet, Rad4 se fixe sur l'ADN simple brin opposé à

celui contenant la lésion en insérant sa double épingle à cheveu beta à la jonction entre l'ADN double brin et l'ADN simple brin (Min and Pavletich, 2007).

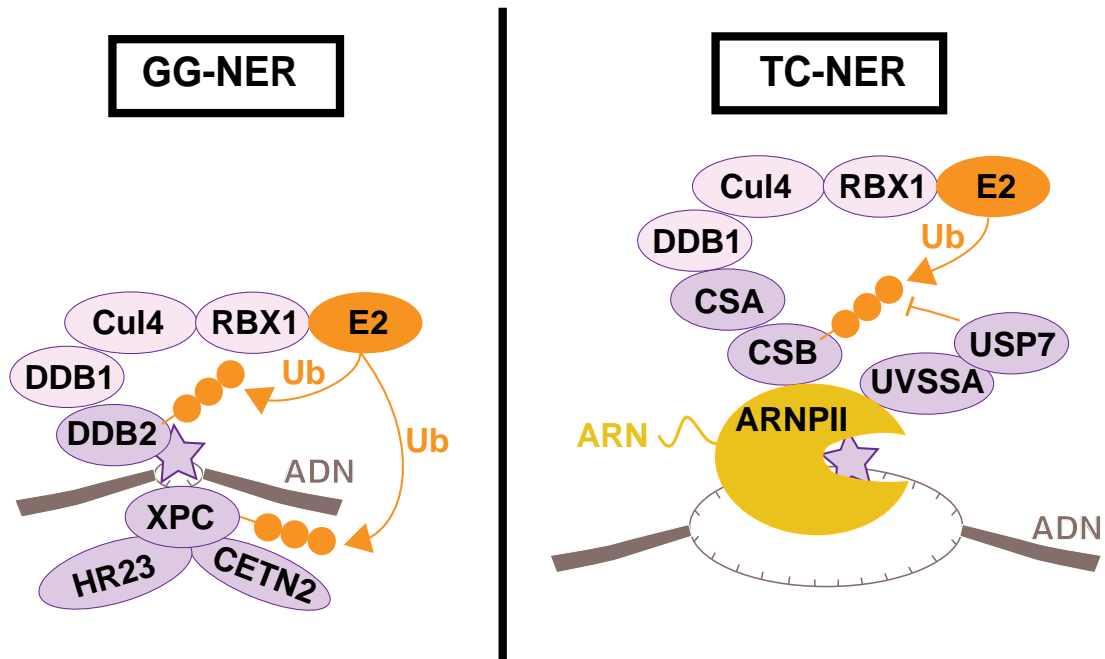


Figure 5 : Schéma des complexes protéiques impliqués dans la détection des lésions de l'ADN induites par les UVC chez l'homme. Au sein du GG-NER, les dommages à l'ADN (étoile violette) sont détectés soit directement par DDB2, soit indirectement par XPC et dans la voie TC-NER, ils sont reconnus par l'ARN Polymerase II bloquée au niveau du dommage. → et ← indiquent des réactions d'ubiquitylation et de dé-ubiquitylation respectivement. L'interaction entre CSA et UVSSA n'a pas été indiquée par souci de clarté. RBX1 : RING Box 1. Données tirées des revues (Alekseev and Coin, 2015; Marteijn et al., 2014; Nusspikel, 2009).

Bien que XPC soit essentielle à la voie GG-NER, les CPD sont très mal reconnus par XPC (Sugasawa et al., 2001) car ces dommages n'induisent pas de déstabilisation majeure de la double hélice d'ADN (Kim et al., 1995). Ainsi, l'élimination des CPD est assurée grâce à l'intervention additionnelle du complexe UV-DDB (UV-DNA Damage Binding complex) (Figure 5). Ce complexe, à activité E3-ubiquitine ligase, est composé de DDB2 (aussi nommé XPE) (Chu and Chang, 1988), et de la base protéique E3, DDB1-CUL4 (Cullin 4)-RBX1 (RING Box 1) (Groisman et al., 2003). Bien que UV-DDB ne soit pas strictement requis pour la réparation par NER *in vitro* (Aboussekhra et al., 1995; Wakasugi et al., 2002), son rôle prépondérant dans l'élimination des CPD et des 6-4PP est incontestable *in vivo* (Alekseev et al., 2005; Hwang et al., 1999; Keeney et al., 1994; Li et al., 2006; Tang et al., 2000). Au sein de UV-DDB, c'est la protéine DDB2 qui assure la reconnaissance des dommages de l'ADN, indépendamment de la présence de DDB1, CUL4 et XPC (El-Mahdy et al., 2006; Li et al., 2006; Wakasugi et al., 2002). En effet, des analyses cristallographiques de DDB1-DDB2 en complexe avec de l'ADN porteur d'un dimère de pyrimidine 6-4PP (Scrima et al., 2008) ou

CPD (Fischer et al., 2011) a permis de révéler que DDB2 se fixe directement sur le brin endommagé, ce qui conduit à un désappariement entre les deux brins d'ADN, structure reconnaissable par XPC. DDB2 favorise ainsi l'accumulation de XPC aux lésions UVC à faible dose d'irradiation ou son maintien à la chromatine endommagée en réponse à des fortes doses d'UVC (Moser et al., 2005; Oh et al., 2011c; Wang et al., 2004). Enfin, dans un système artificiel d'accrochage à la chromatine en l'absence de dommages UVC, DDB2 permet le recrutement de XPC mais pas celui des facteurs NER plus tardifs (Ziani et al., 2014).

Des recherches ont également été conduites afin de déterminer comment la voie GG-NER est finement orchestrée dans le temps. En particulier, XPC et DDB2 sont sujets à de nombreuses modifications post-traductionnelles qui régulent leur activité et/ou leur persistance aux sites de dommages (cf. revues (Dijk et al., 2014; Marteijn et al., 2014; van Cuijk et al., 2014) et (Matsumoto et al., 2015)). Par exemple, une fois recruté, UV-DDB poly-ubiquityle XPC et DDB2 (**Figure 5**), conduisant à la dégradation protéolytique de DDB2 et au maintien de XPC aux sites de dommages (El-Mahdy et al., 2006; Rapić-Otrin et al., 2002; Sugawara et al., 2005). Cependant, l'importance fonctionnelle des modifications post-traductionnelles de ces facteurs est encore peu caractérisée et des études complémentaires sont donc nécessaires afin de mieux comprendre comment est régulée l'action coordonnée de DDB2 et XPC dans le GG-NER.

1.2.2. Réparation couplée à la transcription (TC-NER)

Malgré l'activité de la voie GG-NER, les dommages induits par les UVC, notamment les CPD, sont réparés de manière lente et peu efficace dans les cellules de mammifères (plus de 24 h (Ehmann et al., 1978; Mitchell et al., 1985)). Ces dommages interfèrent donc avec les processus de réplication et de transcription car les ADN et ARN polymérase se retrouvent généralement bloquées au niveau de la lésion. Contrairement aux ADN polymérase, aucune ARN polymérase spécialisée dans la synthèse translésionnelle n'a été découverte à ce jour chez l'homme. Ainsi, une voie particulière de réparation a été mise en place par les cellules pour détecter spécifiquement les dommages situés sur le brin transcrit des gènes actifs, appelé TC-NER (processus non limité aux dommages générés par les UVC, cf. revues (Hanawalt and Spivak, 2008; Spivak and Ganesan, 2014; Vermeulen and Foustieri, 2013)).

Les facteurs de réparation impliqués dans le TC-NER ne reconnaissent pas directement le dommage, mais détectent la présence de l'ARNPII (ARN polymérase II) qui est bloquée à la lésion. En effet, des données *in vitro* ont montré que cette ARNPII bloquée recouvre 35 nucléotides d'une molécule d'ADN contenant un CPD (10 nucléotides en amont + 15 nucléotides en aval du dommage (Tornaletti et al., 1999)), ce qui limite l'accès à la lésion pour les facteurs NER (Brueckner et al., 2007). La machinerie TC-NER permettrait

alors de « dissocier » l'ARNPII du dommage, les mécanismes sous-jacents restant à élucider (discuté dans la partie 1.3).

Le modèle de détection des dommages par TC-NER actuellement proposé dans la littérature est le suivant (Marteijn et al., 2014) : en l'absence de dommages, le facteur CSB (Cockayne Syndrom protein B ou ERCC6) se fixe transitoirement sur l'ARNPII mais cette interaction est stabilisée quand l'ARNPII se retrouve bloquée aux sites de lésions (van den Boom et al., 2004). CSB assure ensuite le recrutement de CSA (ou ERCC8) (Kamiuchi et al., 2002) et du complexe E3 ubiquitine ligase associé (complexe CSA-DDB1-Cul4-RBX1) ainsi que des facteurs plus tardifs du NER (Fousteri et al., 2006). Puis, CSA facilite l'enrichissement aux sites de dommages d'autres protéines du TC-NER, entre autres UVSSA (UV-Stimulated Scaffold protein A, cette association stabiliserait l'interaction entre UVSSA et l'ARNPII (Schwertman et al., 2013)) et XAB2 (XPA Binding protein 2) (Fousteri et al., 2006). Une autre fonction du complexe CSA est de poly-ubiquityler CSB, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Groisman et al., 2006). Cette dégradation, qui doit être finement contrôlé pour assurer un bon déroulement du TC-NER, est contrebalancée par l'activité de dé-ubiquitylation d'USP7 (Ubiquitin Specific Processing protease 7), recruté aux sites de lésions par UVSSA (Schwertman et al., 2013) (**Figure 5**).

En conclusion, le déroulement de la voie TC-NER n'a pas encore été clairement déterminé car bien que la liste des protéines impliquées dans ce processus s'allonge au fur et à mesure des études, leur mécanisme d'action est loin d'être actuellement compris (Spivak and Ganesan, 2014; Vermeulen and Fousteri, 2013). Cependant, l'importance fonctionnelle de ces facteurs, et plus globalement des protéines nécessaires pour la réparation ou la tolérance des dommages induits par les UV est indéniable, comme le démontre l'existence de pathologies extrêmement sévères liées à des dysfonctionnements de ces voies de réponse aux dommages.

1.2.3. Pathologies associées

Des mutations dans les séquences des gènes codant des facteurs de réparation NER (ainsi que de la polymérase translésionnelle η) ont été associées à de nombreuses maladies rares et héréditaires, présentant des conséquences cliniques très variées ((Marteijn et al., 2014) et **Tableau 1**). Des études de complémentation par fusion de cellules issues de tels patients (Bootsma et al., 1975; Tanaka et al., 1981; Zhang et al., 2012) ont notamment permis l'identification, le clonage et la caractérisation de facteurs du NER. Alors qu'une anomalie dans la voie GG-NER est définie par un risque accru de développement de cancers cutanés, les personnes atteintes d'un dysfonctionnement de la voie TC-NER présentent généralement des troubles neurologiques et des signes de vieillissement prématuré sans prédisposition particulière aux cancers. Quant aux mutations des protéines communes aux voies GG-NER et TC-NER, elles sont à l'origine d'un large spectre de symptômes. Le lien direct entre ces

maladies et un défaut de réparation NER a été récemment l'objet d'une controverse. En effet, en plus de réparer l'ADN endommagé, certains facteurs du NER possèdent d'autres fonctions cellulaires, comme réguler l'activité transcriptionnelle (Fong et al., 2013; Marteijn et al., 2014). Ainsi, les symptômes développés par les patients pourraient être le résultat d'une dérégulation du profil d'expression génique des cellules plutôt que la conséquence directe d'un défaut de réparation de l'ADN (Wang et al., 2014).

Maladie	Principales caractéristiques cliniques	Facteurs mutés
Xeroderma Pigmentosum (XP)	Hypersensibilité au soleil avec signes d'hypo et d'hyperpigmentation + Risque accru de cancers de la peau	XPA, XPC, XPD, XPE (DDB2), XPF, XPG
XP variant (XP-V)	Symptômes XP + Hyper-mutabilité des cellules de patients après irradiation UV	Polη (polymérase TLS)
Syndrome de Cockayne (CS)	Hypersensibilité au soleil + Retard de croissance + Neurodégénération précoce + vieillissement accéléré (espérance de vie : 12 ans)	CSA, CSB
Syndrome cérébro-oculo-facio squelettique (COFS)	Symptômes CS mais aggravés (espérance de vie : 2 ans)	XPD, ERCC1, CSB
Syndrome de sensibilité aux UV (UVSS)	Hypersensibilité au soleil	CSA, CSB, UVSSA
Syndrome De Sanctis-Cacchione	Symptômes XP + Retard de développement + Neurodégénération tardive	XPA
Trichothiodystrophie (TTD)	Symptômes CS + cheveux et ongles cassants + peau écailleuse	XPB, XPD, TTDA
XP/CS	Symptômes XP & CS	XPB, XPD, XPG

Tableau 1 : Principales maladies associées à des défauts de réparation ou de tolérance aux dommages générés par les UV. Données tirées des revues (DiGiovanna and Kraemer, 2012; Kraemer et al., 2007; Marteijn et al., 2014; Niedernhofer et al., 2011).

1.3. Autres réponses cellulaires induites par les UVC : zoom sur la régulation de l'activité transcriptionnelle des cellules

Les dommages générés par les UVC n'enclenchent pas seulement l'activation des voies de réparation des lésions mais aussi induisent d'autres réponses cellulaires intimement liées, telles que l'activation temporaire des points de contrôle du cycle cellulaire (cf. revue (Sertic et al., 2012)) et l'arrêt provisoire des processus de réplication et de transcription. L'incorporation d'analogues d'uridine radio-marqués dans les transcrits naissants est ainsi fortement diminuée après irradiation globale de fibroblastes humains aux UV, avant de reprendre dans les heures qui suivent l'irradiation (Mayne and Lehmann, 1982). Cette régulation touche à la fois les ARN transcrits par les ARNPI et II, mais l'étude du contrôle par les UVC de la transcription par l'ARNPI n'en est qu'à ses débuts (Calkins et al., 2013). De plus, certains gènes échappent à l'inhibition de la transcription par les UVC, comme les gènes codant des facteurs NER et autres protéines de stress, dont l'expression est au contraire induite (cf. revue (Christmann and Kaina, 2013)). Comprendre les mécanismes qui contrôlent

l'activité transcriptionnelle post-irradiation UVC dans les cellules humaines a été l'objet d'intenses recherches, ce que je vais maintenant vous détailler.

1.3.1. Mécanismes d'inhibition de la transcription

L'arrêt de la transcription induite par les UVC est principalement vu comme un processus passif, dû au fait que les ARNPII en élongation sont généralement incapables de franchir la lésion et s'accumulent au niveau du dommage (Spivak and Ganesan, 2014; Vermeulen and Foustari, 2013; Wilson et al., 2013). En accord avec cette idée, irradier des cellules aux UVC à travers des filtres percés de micropores a permis de démontrer que l'inhibition de la transcription est un processus localisé aux sites de dommages de l'ADN (Moné et al., 2001). Cependant, des données de la littérature suggèrent que des mécanismes plus globaux seraient également en jeu pour réduire l'activité transcriptionnelle des cellules endommagées. Des extraits nucléaires de cellules obtenus 1 h après irradiation aux UVC sont incapables de réaliser de la transcription *in vitro* (Rockx et al., 2000). Ce défaut est dû à l'absence de formes hypo-phosphorylées de l'ARNPII nécessaires pour initier la transcription (Heine et al., 2008; Rockx et al., 2000). Cette perte d'initiation est en partie compensée par inhibition du protéasome (Heine et al., 2008), ce qui suggère que la dégradation de certains facteurs cellulaires en réponse aux dommages UVC est requise pour inhiber la transcription. Parmi ces facteurs, l'ARNPII bloquée aux sites de lésions est un candidat intéressant, puisque les UVC peuvent induire la poly-ubiquitylation puis la dégradation de la sous-unité la plus large de ce complexe, RPB1 (RNA Pol II subunit 1) (**Figure 6**). Le mécanisme contrôlant la dégradation de RPB1 a été principalement étudié chez la levure, et fait intervenir plusieurs complexes E3-ubiquitine ligase (cf. revue (Wilson et al., 2013)). L'identification d'homologues humains de ces complexes suggère que ce mécanisme est conservé chez l'homme. Néanmoins, des recherches complémentaires sont indispensables afin d'évaluer le rôle de la dégradation UV-dépendante de l'ARNPII dans le processus d'arrêt de la transcription dans les cellules humaines. Enfin, il ne faut pas négliger l'importance potentielle de mécanismes épigénétiques, qui seront discutés en partie 3.4.1.

1.3.2. Mécanismes de reprise de la transcription

La reprise de la transcription nécessite une machinerie de réparation TC-NER fonctionnelle (Mayne and Lehmann, 1982; Nakatsu et al., 2000; Schwertman et al., 2013) car celle-ci assure la « dissociation » entre l'ARNPII bloquée et la lésion. Cependant, au vu de nos connaissances limitées sur le devenir de cette ARNPII, plusieurs hypothèses permettant d'expliquer le redémarrage de l'expression des gènes sont envisageables (**Figure 6**).

La translocation en arrière de l'ARNPII (ou « marche arrière ») est l'hypothèse actuellement favorisée par la communauté scientifique (Spivak and Ganesan, 2014;

Vermeulen and Foustéri, 2013). D'une part, ce mécanisme permettrait de conserver sur l'ADN l'ARNPII et son transcrite (Donahue et al., 1994) et d'autre part, il a déjà été observé aux sites de pauses naturelles de la transcription chez la levure (Sigurdsson et al., 2010). Néanmoins, pour que l'activité transcriptionnelle reprenne, le nucléotide mal-incorporé par l'ARNPII en face du dommage (Brueckner et al., 2007) doit être éliminé. Cette étape nécessiterait la présence de TFIIIS (Transcription Factor IIS), facteur connu pour stimuler l'activité intrinsèque de clivage de transcrite par l'ARNPII (Reines et al., 1993). En effet, TFIIIS est recruté par les protéines CS aux sites de dommages de l'ADN induits par les UVC (Foustéri et al., 2006) et semble requis pour le redémarrage de la transcription post irradiation aux UVC (Jensen and Mullenders, 2010) même si des données conflictuelles existent dans la littérature (Mackinnon-Roy et al., 2011). Donc, les détails moléculaires ainsi que l'importance *in vivo* de ce processus de « marche arrière » de l'ARNPII en réponse aux dommages restent à préciser.

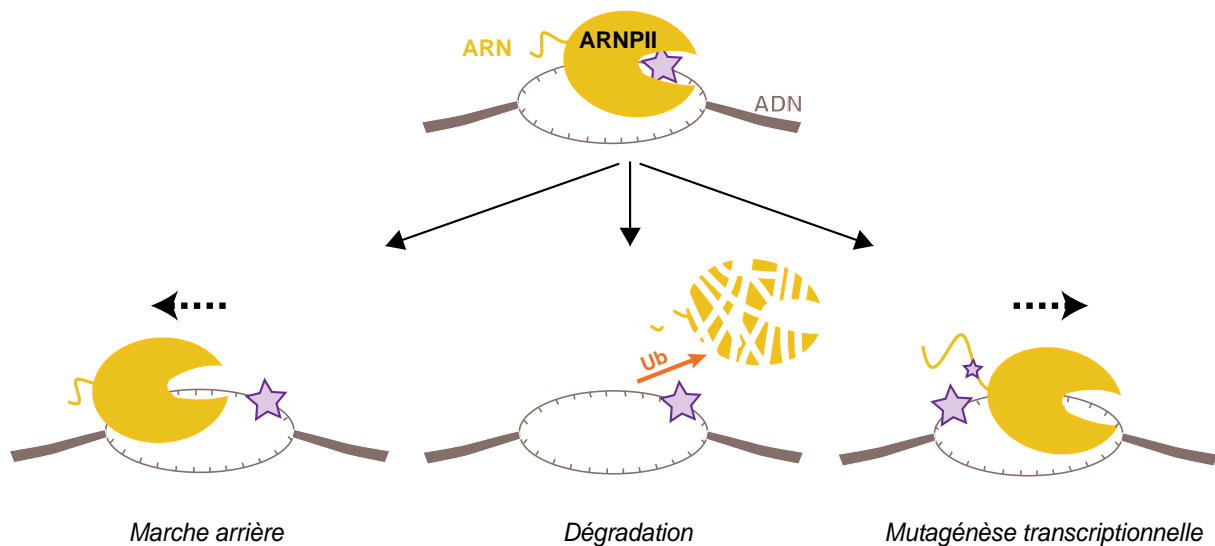


Figure 6 : Hypothèses décrivant le devenir potentiel de l'ARNPII bloquée au site de dommage. Trois scénarii sont envisageables: (i) l'ARNPII bloquée ferait marche arrière, (ii) serait poly-ubiquitinée (flèche orange) avant d'être décrochée de l'ADN et envoyée vers le protéasome, (iii) continuerait de transcrire ce qui pourrait conduire à la production d'un transcrite muté (petite étoile violette). Scénarii décrits dans la revue (Spivak and Ganesan, 2014).

D'autres mécanismes de reprise de transcription ont été avancés, même s'ils sont pour l'instant considérés comme des mécanismes de dernier recours, une inhibition prolongée de la transcription entraînant le plus souvent la mort cellulaire (Figure 6). D'une part, des expériences réalisées chez la levure ont mis en avant que l'ARNPII pourrait être poly-ubiquitylée puis dégradée après irradiation aux UVC (cf. revues (Marteijn et al., 2014; Wilson et al., 2013), permettant ainsi à la machinerie NER d'avoir accès et de réparer la lésion avant que la transcription ne reprenne. Mais les modalités contrôlant cette dégradation nécessitent

d'être précisées chez les mammifères. D'autre part, des analyses *in vitro* (Walmacq et al., 2012) et des expériences réalisées sur des cellules humaines déficientes dans la voie TC-NER (Marietta and Brooks, 2007) suggèrent que, dans certains cas extrêmes, l'ARNPII serait capable de franchir les CPD mais avec un risque accru de production de transcrits aberrants, potentiellement toxiques pour la cellule. De plus, de nouveaux facteurs cellulaires requis pour le redémarrage de l'expression génique post irradiation aux UVC ont été découverts (cf. revue (Gaillard and Aguilera, 2013)). Par exemple, XAB2 et ELL (Eleven–nineteen Lysine-rich Leukemia), mobilisés aux sites de lésions UVC par les protéines CS et le complexe TFIIF respectivement, serviraient de plateforme pour le recrutement de protéines stimulant la réparation et/ou le redémarrage de la transcription (Kuraoka et al., 2008; Mourgues et al., 2013; Nakatsu et al., 2000). Ainsi, disséquer le rôle exact de ces facteurs dans la réponse aux dommages générés par les UVC devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes régulant la reprise de la transcription post dommage. Enfin, des processus épigénétiques semblent également à l'œuvre (présentés en partie 3.4.2).

En résumé, en réponse à une irradiation aux UVC, l'activité transcriptionnelle des cellules est arrêtée et reprend après réparation des lésions. Cependant, la régulation de cette activité n'est pas limitée aux dommages induits par les UVC (cf. **Annexe 1**), et son étude mécanistique dans le cadre d'autres types de lésions, telles que les cassures double brin de l'ADN, devrait apporter un éclairage nouveau. Il est aussi important de considérer que dans les cellules eucaryotes, les mécanismes moléculaires de réparation des dommages provoqués par les UVC n'opèrent pas sur un ADN nu, mais sur un substrat organisé en chromatine, généralement considérée comme une barrière limitant la réparation de l'ADN (Hara et al., 2000; Wang et al., 1991). Cependant, la chromatine apporte aussi un niveau supplémentaire de régulation des activités cellulaires, que je vais maintenant vous expliciter.

2. Organisation de l'ADN en chromatine

Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines formant ainsi un complexe appelé chromatine. Celle-ci a un rôle à la fois structural et fonctionnel. En effet, la chromatine permet de compacter l'ensemble de notre matériel génétique, soit environ deux mètres, dans un noyau cellulaire de 10 à 20 μm de diamètre. Mais cette structure est également modulable, comme le montre l'existence de nombreuses variations de ses composantes élémentaires (discuté dans le partie 2.2). Ce sont ces variations qui véhiculent l'information épigénétique, information définissant l'identité de chaque cellule de l'organisme.

2.1 La chromatine : structure de base

2.1.1. Historique

Le terme chromatine (du grec « khroma », signifiant couleur) est apparu au début des années 1880 à partir d'observations de cellules en mitose par Walther Flemming (Flemming, 1882). La chromatine a été appelée ainsi en raison de sa capacité à retenir des colorants. Les composantes protéiques majoritaires de la chromatine, les histones, ont quant à elles été découvertes en 1884 par Albrecht Kossel (Kossel, 1884). Mais, ce n'est qu'au siècle suivant que la chromatine et son organisation furent l'objet d'études structurales et fonctionnelles poussées (**Figure 7**).

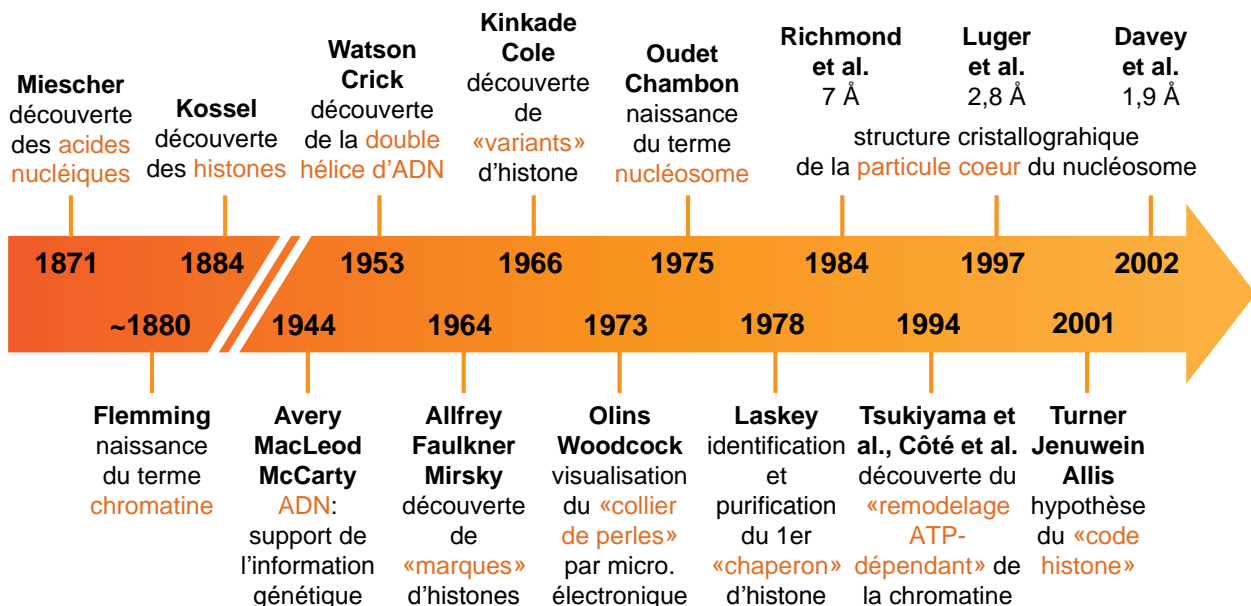


Figure 7 : Principaux faits marquants de l'histoire de la chromatine. micro: microscopie. Figure adaptée de (Olins and Olins, 2003).

Tout d'abord, l'autre constituant principal de la chromatine, l'ADN, fut identifié comme support de l'information génétique (Avery et al., 1944) et quelques années plus tard, sa structure en double hélice a été caractérisée (Watson and Crick, 1953). Puis, l'organisation de la chromatine à l'échelle moléculaire a été résolue grâce à des analyses biochimiques de digestion aux nucléases et des études biophysiques de microscopie électronique et de cristallographie (cf. revue (Olins and Olins, 2003) et **Figure 7**). En effet, ces travaux ont révélé que la chromatine est une structure répétée, dans laquelle l'ADN s'enroule autour de particules, qui furent appelées des nucléosomes (Kornberg, 1974; Oudet et al., 1975) (**Figure 8**). D'autres recherches se sont finalement intéressées à l'importance fonctionnelle de la chromatine, ce qui a mis en lumière l'aspect dynamique de cette architecture et son rôle dans l'établissement de l'identité cellulaire (discuté dans la partie 2.2).

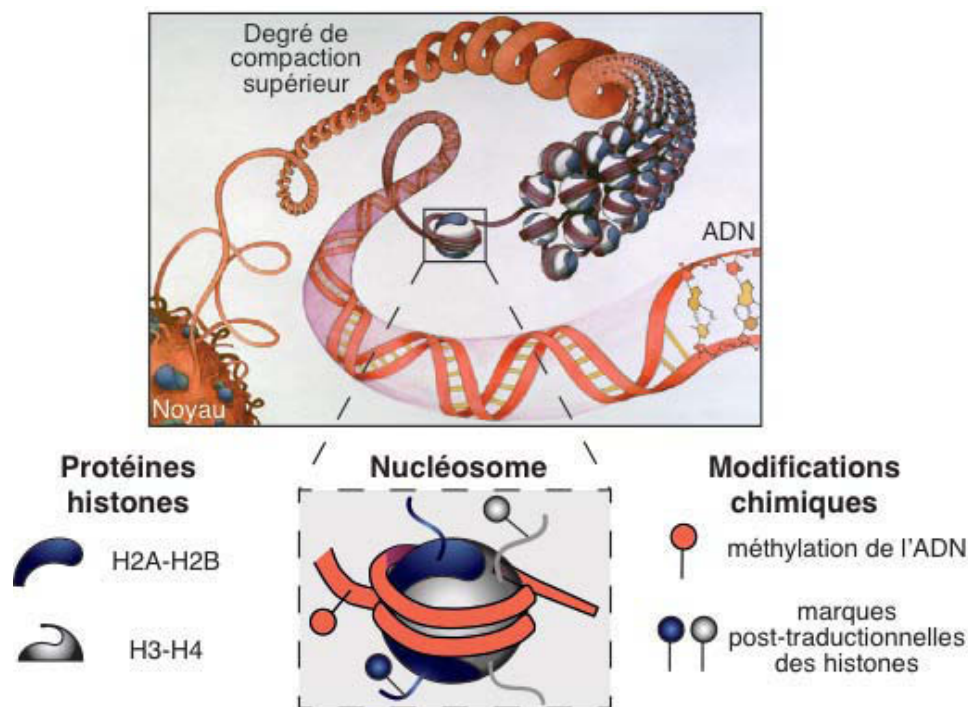


Figure 8 : Illustration de la structure répétée de la chromatine avec son unité de base, le nucléosome. L'ADN et les protéines histones qui constituent le nucléosome sont susceptibles d'être modifiés chimiquement et sont donc des vecteurs clés de l'information épigénétique. Par souci de clarté, l'histone lien H1 n'a pas été schématisée. L'aquarelle du haut a été réalisée par N. Bouvier pour G. Almouzni. Figure adaptée de l'Annexe 2.

2.1.2. Le nucléosome : unité fondamentale de la chromatine

L'unité de base de la chromatine, le nucléosome, est composée d'une particule cœur et d'une région inter-nucléosomale, de longueur variable selon les espèces et types cellulaires (Kornberg, 1977) et à laquelle se fixe l'histone lien H1. Des analyses biochimiques puis cristallographiques de la particule cœur (Davey et al., 2002; Eickbush and Moudrianakis, 1978; Luger et al., 1997; Richmond et al., 1984) ont démontré que ce cœur est formé d'un

octamère de protéines histones autour duquel s'enroulent environ 147 pb d'ADN (**Figures 8 & 9**). Au sein de l'octamère, un tétramère central d'histones $(H3-H4)_2$ est associé avec deux dimères périphériques d'histones $(H2A-H2B)$ grâce à des interactions entre H2B et H4. Quant à l'histone lien H1, elle lie 20 pb d'ADN au niveau du point d'entrée-sortie de l'ADN à la surface de la particule cœur du nucléosome (McGhee and Felsenfeld, 1980).

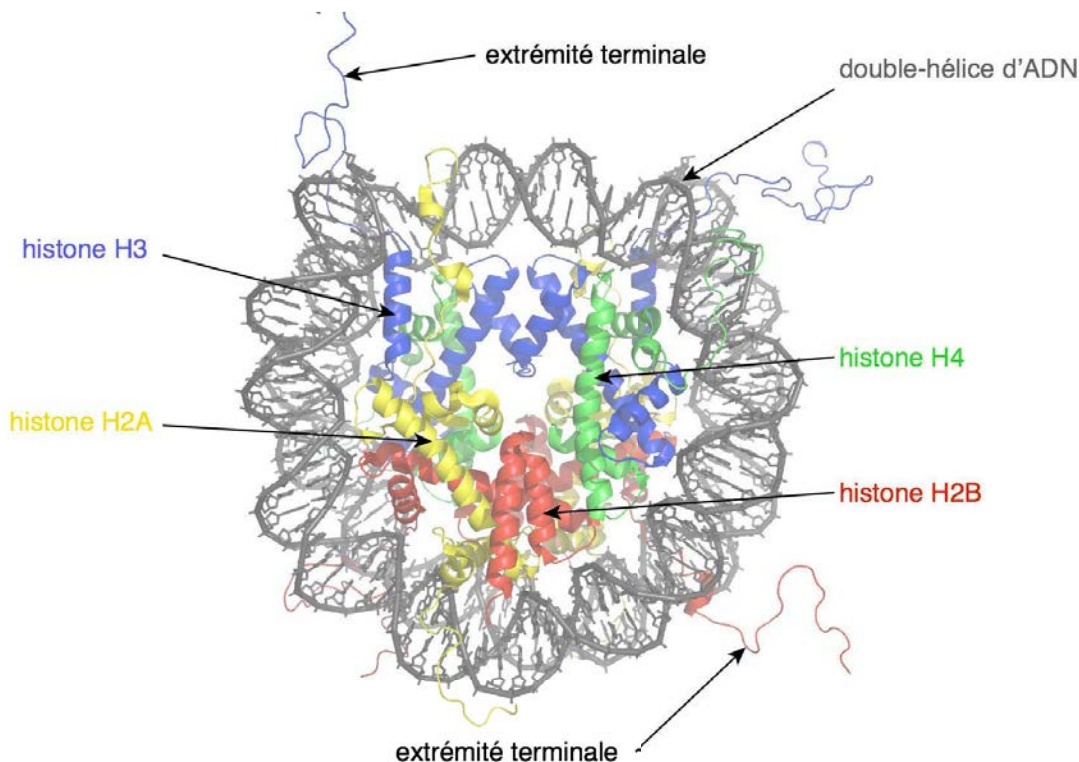


Figure 9 : Structure cristallographique de la particule cœur du nucléosome. La double hélice d'ADN forme une super-hélice gauche autour d'un octamère d'histones (1,65 tours). Vue du dessus, figure adaptée de (Davey et al., 2002) (Protein Data Bank ID: 1KX5).

Les histones sont de petites protéines (11-22 kDa) chargées positivement du fait de leur richesse en acides aminés basiques. Ceci leur permet d'établir des contacts électrostatiques avec le squelette désoxyribose-phosphate de l'ADN. Elles comprennent un motif caractéristique, le domaine « histone-fold » ou globulaire, composé de trois hélices α séparés par des boucles (Arents and Moudrianakis, 1995), qui assure le maintien de l'organisation nucléosomale (**Figure 9**). De part et d'autre de ce domaine, s'étendent les extrémités N- et C-terminales des histones, extrémités flexibles exposées à la surface du nucléosome (Davey et al., 2002; Luger et al., 1997). Contrairement à l'histone lien H1, les histones de la particule cœur du nucléosome sont très conservées au cours de l'évolution (Harshman et al., 2013; Malik and Henikoff, 2003). La mobilité au sein de la chromatine est une autre caractéristique qui diffère entre l'histone lien et les histones cœurs. En effet, des expériences de redistribution de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP) sur des cellules de mammifères exprimant des formes étiquetées des histones ont démontré que les histones cœurs, et plus particulièrement H3 et H4, sont très stables (avec un temps de

résidence de plusieurs heures). Par contre, l'histone lien H1 a une mobilité accrue, avec un temps de résidence de l'ordre de quelques minutes (Kimura, 2005).

2.1.3. Niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine

L'enroulement de l'ADN autour des protéines histones constitue le premier degré de compaction de l'ADN, et sert de base à des niveaux supérieurs d'organisation de la chromatine (**Figure 10**).

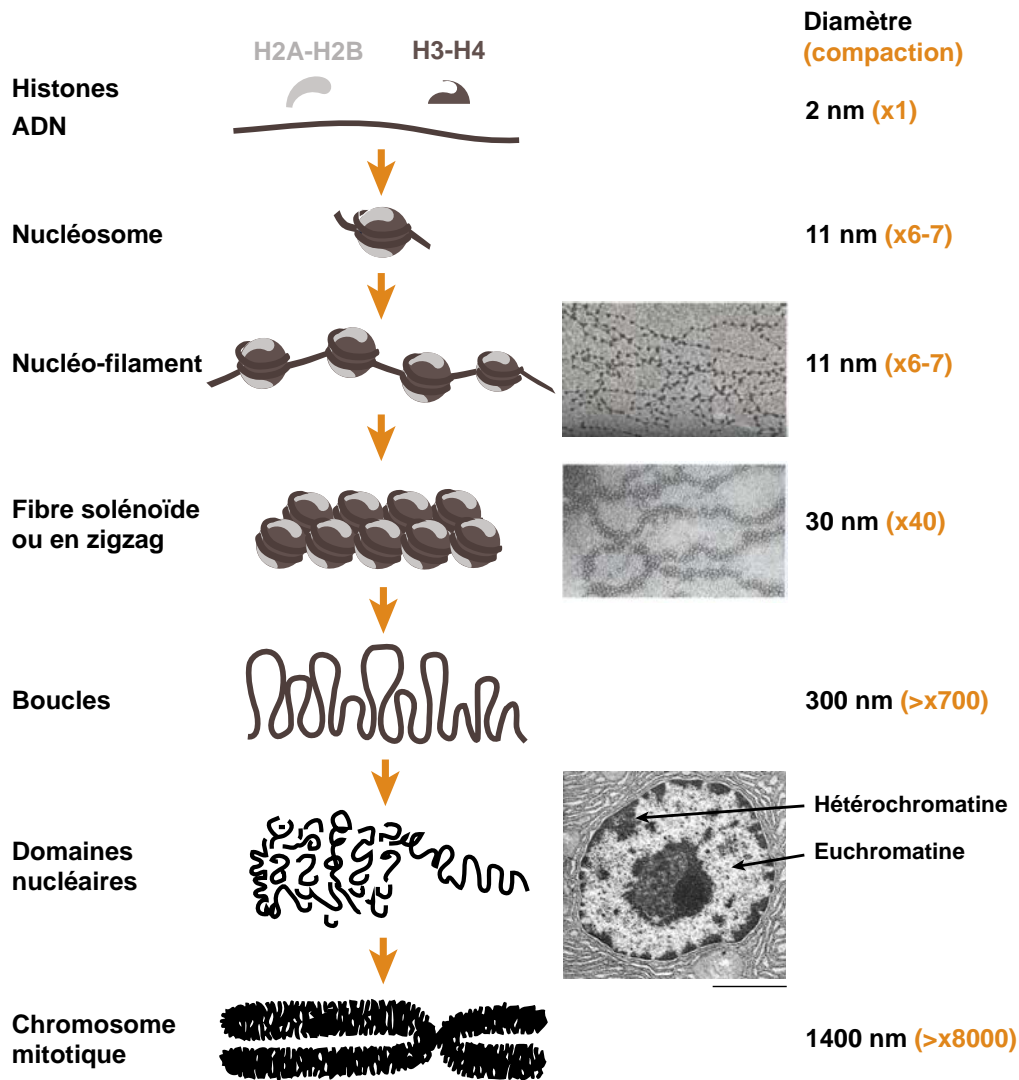


Figure 10 : Illustration des différents niveaux de compaction de la chromatine. Les nucléosomes sont tout d'abord régulièrement espacés formant ainsi un nucléo-filament aussi appelé « collier de perle ». Celui-ci s'organise en fibre de 30 nm dont la structure et l'existence *in vivo* font toujours débat. Des structures encore plus compactes sont ensuite mises en place, telles les boucles, les domaines nucléaires et les chromosomes mitotiques. A droite, de haut en bas, sont représentés des clichés de microscopie électronique illustrant l'organisation du nucléo-filament, de la fibre de 30 nm et de domaines nucléaires caractéristiques que sont l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'histone lien H1 pas été schématisée par souci de clarté. Barre d'échelle : 5 μ m. Figure adaptée de (Felsenfeld and Groudine, 2003; Ridgway and Almouzni, 2000).

Le nucléo-filament, composé de l'enchaînement des nucléosomes, se compacte afin de former la fibre de 30 nm. Deux modèles d'agencement de cette fibre ont été proposés *in vitro*, solénoïde ou en zigzag, qui diffèrent selon quels nucléosomes voisins établissent des contacts entre eux (cf. revue (Razin and Gavrillov, 2014)). Cependant, des données contradictoires existent dans la littérature concernant la présence d'une telle organisation *in vivo*, des structures plus compactes de la chromatine pourraient en fait être obtenues par « accollement » de fibres voisines. Des techniques d'hybridation *in situ* et plus récemment de capture de conformation de chromosomes ont de plus démontré que les chromosomes interphasiques ne sont pas répartis au hasard dans le noyau des cellules mais occupent des espaces bien définis, appelés territoires chromosomiques (cf. revue (Cremer and Cremer, 2010)). Le taux de compaction maximal de la chromatine est enfin obtenu dans les chromosomes mitotiques, dont la condensation est nécessaire pour le bon déroulement de la mitose.

Ces niveaux supérieurs d'organisation de la chromatine ne font pas uniquement intervenir les protéines histones mais également d'autres composants, tels les ARN non codants structuraux et les protéines architecturales (cf. revues (Caudron-Herger and Rippe, 2012; McBryant et al., 2006), qui participent à la mise en place de domaines fonctionnels dans le noyau (**Tableau 2**).

Composants	Importance fonctionnelle	Références
Protéines architecturales		
HMG A, B, N (High Mobility Group)	Abondantes, ubiquitaires, hautement mobiles, elles altèrent la structure de la chromatine, facilitant ainsi les processus de transcription et de réparation de l'ADN	(Gerlitz et al., 2009)
HP1 α, β, γ (Heterochromatin Protein)	Initialement découvertes dans l'hétérochromatine, elles régulent diverses fonctions cellulaires, telles la transcription et la réparation de l'ADN	(Canzio et al., 2014)
ARN non codants structuraux		
ARN péricentrique	Impliqué dans l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine présente autour des centromères chez la souris	(Almouzni and Probst, 2011)
TERRA (telomere-repeat-encoding RNA)	Important pour la formation de l'hétérochromatine et le maintien de la structure des télomères	(Maicher et al., 2014)
Xist (X-inactive-specific-transcript)	Requis pour l'initiation de l'inactivation du chromosome X chez les femelles de mammifères	(Chaligné and Heard, 2014)

Tableau 2 : Quelques exemples de composants non-histones participant à l'architecture de la chromatine dans les cellules de mammifères. Les références correspondent à des revues détaillant les caractéristiques de ces composants.

La chromatine assure la compaction de notre matériel génétique dans le noyau de chaque cellule de l'organisme. Cependant, au-delà de cette fonction structurale, la chromatine, du fait de sa nature dynamique, contrôle l'accès à l'ADN d'importantes machineries cellulaires telles que celles impliquées dans la réplication, la réparation et la transcription.

Cette plasticité favorise le bon déroulement des fonctions essentielles du génome et l'établissement de l'identité cellulaire.

2.2. La chromatine : structure modulable porteuse de l'information épigénétique

L'organisation de base de la chromatine présentée dans la partie précédente est en fait modulable, grâce à l'existence de variations dans les composantes élémentaires de la chromatine. En effet, cette structure peut se présenter sous différents états de compaction, l'ADN et les histones sont la cible de modifications covalentes réversibles et les histones se déclinent en différentes formes variantes (**Figures 10 - 12, Tableaux 3 - 4**).

2.2.1. Régulation du niveau de compaction et remodelage de la chromatine

L'observation initiale de noyaux de cellules eucaryotes par microscopie électronique apporta un exemple caractéristique de régulation du niveau de compaction de la chromatine (Heitz, 1928) (**Figure 10**). On y distingue l'euchromatine, structure relâchée qui ne se compacte qu'au moment de la mitose, et l'hétérochromatine, région chromatinienne compacte restant condensée tout le long du cycle cellulaire. Il est classiquement admis que l'euchromatine est riche en gènes et est donc le siège de l'activité transcriptionnelle tandis que l'hétérochromatine comprend les régions transcriptionnellement silencieuses, notamment les séquences répétées du génome.

L'état de compaction différentielle de la chromatine est le fruit de la présence coordonnée de différentes protéines cellulaires, dont les histones liens H1, les protéines architecturales et les ARN structuraux (**Tableau 2**) ainsi que les facteurs de remodelage de la chromatine (cf. revues (Bartholomew, 2013; Caudron-Herger and Rippe, 2012; Harshman et al., 2013; McBryant et al., 2006)). Ces derniers sont principalement regroupés en quatre familles, pouvant former des complexes multi-protéiques, avec toujours une sous-unité catalytique de type ATPase (**Figure 11**). Ils utilisent alors l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP afin de rompre des contacts ADN-histones, ce qui leur permet de faire glisser les nucléosomes le long de la fibre chromatinienne voire même de les désassembler. De plus, de concert avec les protéines escortant les histones, appelées chaperons d'histones (cf. partie 2.2.3), ils peuvent également contrôler l'assemblage et la composition des nucléosomes, par une action d'échange de formes variantes d'histones. Ainsi, les facteurs de remodelage de la chromatine sont des protéines clés de la dynamique de la chromatine qui régulent l'accès à l'ADN des machineries de réplication, réparation et transcription. Néanmoins, comment ces facteurs sont ciblés à des régions particulières du génome afin d'y modifier la structure de la chromatine n'est pas encore complètement compris, ce processus nécessitant le plus souvent des facteurs additionnels, comme la présence de modifications post-traductionnelles des histones (cf. revue (Swygert and Peterson, 2014)).

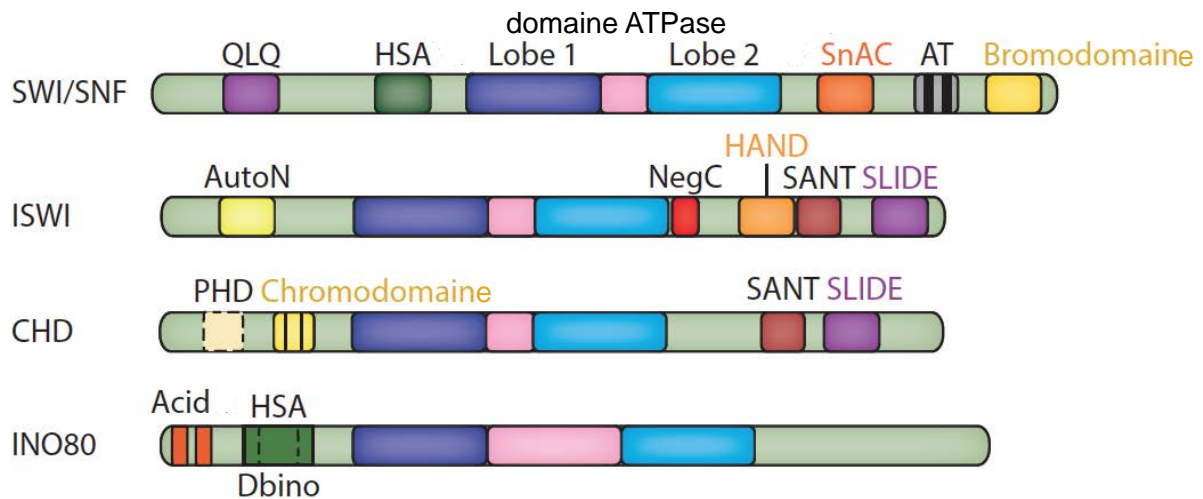


Figure 11 : Représentation schématique des quatre familles principales de facteurs de remodelage de la chromatine. Chaque famille se distingue par leur sous-unité catalytique, sur la base de l'homologie de séquence du domaine ATPase (lobes 1 et 2 séparés par une région lien) et de la présence d'autres domaines. Acid: Acidic ; CHD: Chromodomain Helicase DNA binding protein, Dbino: DNA binding domain of INO80, HSA: Helicase/SANT-Associated, INO80: Inositol requiring 80, ISWI: Imitation Switch, SANT: Swi3 Ada2 N-CoR TFIIB, SLIDE: SANT-like, SnAC: Snf2 ATP Coupling, SWI/SNF: Switch/Sucrose Non Fermentable. Figure adaptée de (Bartholomew, 2013).

2.2.2. Modifications chimiques de l'ADN et des histones

Concernant l'ADN, la modification chimique la plus caractérisée est la méthylation de la base cytosine en position C5 (cf. revues (Rothbart and Strahl, 2014; Schübeler, 2015)). Chez les mammifères, cette méthylation affecte presque exclusivement les dinucléotides CpG et est généralement associée à de la chromatine transcriptionnellement inactive. En effet, elle est susceptible de bloquer directement l'accès à l'ADN de facteurs de transcription et/ou aide au recrutement de complexes répresseurs qui modifient le profil de marques post-traductionnelles des histones au niveau des promoteurs des gènes.

L'ADN n'est pas le seul composant du nucléosome à être modifié chimiquement puisque les protéines histones – histones cœurs et histones liens – subissent également des modifications covalentes, ou marques post-traductionnelles (Huang et al., 2014). Il existe une grande variété de modifications, telles que l'acétylation, l'ubiquitination et la sumoylation des lysines, la méthylation des lysines/arginines, la phosphorylation des sérines/thréonines/tyrosines, l'ADP ribosylation, l'isomérisation des prolines, mais la liste énumérée ici n'est pas exhaustive (cf. revue (Rothbart and Strahl, 2014)). Un degré supérieur de variabilité peut même être obtenu pour certaines modifications, comme pour la méthylation des lysines, qui sont susceptibles d'être mono-, di- voire tri-méthylées. Il est également important de noter qu'un acide aminé peut être la cible de différentes modifications, mais que cet acide aminé ne peut porter qu'une seule marque à la fois. Si la

plupart des marques identifiées à ce jour affecte les extrémités N- et C-terminales des histones qui sont exposées à la surface du nucléosome, de plus en plus de modifications présentes dans les domaines globulaires ont été découvertes (cf. **Figure 12** & revues (Kebede et al., 2014; Tessarz and Kouzarides, 2014)). Ces modifications peuvent perturber les contacts ADN/histones et histones/histones au sein de la particule nucléosomale, et sont donc susceptibles de contrôler directement la stabilité des nucléosomes (cf. exemples dans revue (Bowman and Poirier, 2015)).

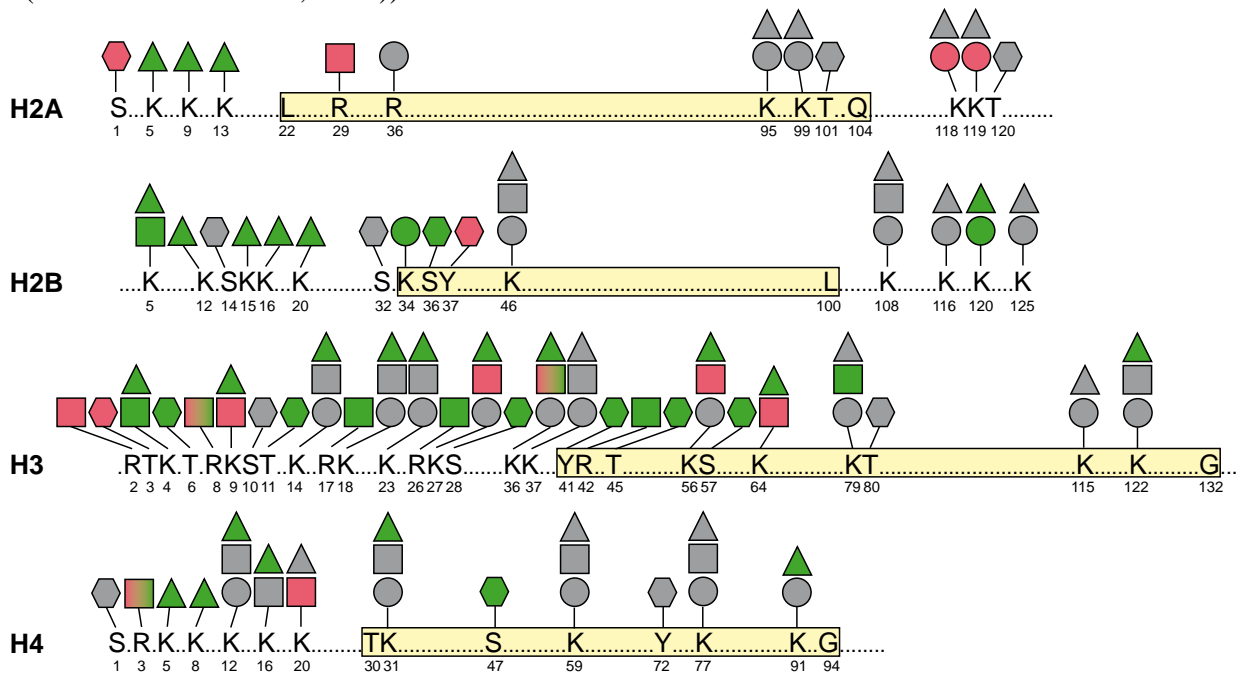


Figure 12 : Quelques exemples de modifications post-traductionnelles des histones présentes dans les cellules humaines. Les acides aminés des domaines globulaires des histones ont été encadrés en jaune. Seules l'acétylation (triangle), la méthylation (carré), l'ubiquitylation (rond) et la phosphorylation (hexagone) ont été représentées. Le vert indique les marques associées à la transcription (importantes pour la transcription de certains gènes et/ou enrichies dans la chromatine transcriptionnellement active), le rouge indique les marques associées à l'inhibition de la transcription (diminuant l'expression de certains gènes et/ou enrichies dans la chromatine transcriptionnellement silencieuse). Le gris indique que le lien entre ces marques et la transcription n'a pas été étudié de façon extensive dans la littérature. Les marques de l'histone lien H1 n'ont pas été schématisées. Données tirées de PhosphoSiteplus et de Histome. Figure adaptée de (Li, 2012).

Comment les modifications post-traductionnelles des histones régulent les activités cellulaires reste une question qui n'a pas été complètement élucidée. Certaines marques peuvent moduler directement la structure de la chromatine, comme l'acétylation des lysines, qui en neutralisant les charges positives de ces acides aminés, déstabilise leur interaction avec l'ADN, permettant ainsi l'ouverture de la chromatine (Shogren-Knaak et al., 2006), et l'accès à l'ADN des machineries de transcription. En outre, ces dernières décennies ont été identifiés des facteurs cellulaires spécifiques qui mettent en place et/ou éliminent des modifications d'histones spécifiques (appelés enzymes de modification des histones) et d'autres qui

reconnaissent des marques d'histones particulières (appelées protéines effectrices) (cf. **Tableau 3** & revue (Bannister and Kouzarides, 2011)). L'identification de ces facteurs a permis de grandes avancées dans notre compréhension des mécanismes de contrôle des fonctions cellulaires par les marques d'histones. Ainsi est apparu dans les années 2000 le concept du « code histone », appliqué principalement dans le contexte de la régulation de l'activité transcriptionnelle (Jenuwein and Allis, 2001). Ce code, reposant initialement sur l'observation d'interactions synergiques et antagonistes entre différentes modifications, correspondrait à une combinaison de marques d'histones interprétée par des protéines effectrices, qui en régulant l'état de compaction de la chromatine, contrôlerait l'expression des gènes.

Marque	Mise en place par	Éliminée par	Reconnue par domaine
Acétylation	HAT (Histone Acétyl Transférase)	HDAC (Histone Dé-Acétyl Transférase)	Bromo, PHD (Plant Homeo)
Méthylation	HMT (Histone Méthyl Transférase)	HDMT (Histone Dé-Méthyl Transférase)	Chromo, PHD, Tudor, MBT (Malignant Brain Tumor), ZF-CW (Zinc Finger with conserved Cys and Trp residues), PWWP (named after a conserved Pro-Trp-Trp-Pro motif), ADD (ATR-X-DNMT3-DNMT3L), répétitions Ankyrines , BAH (Bromo-Associated Homology)
Phosphorylation	Kinase	Phosphatase	BRCT (BRCA1 C-Terminal), 14-3-3 , BIR (Baculovirus IAP repeats)
Ubiquitylation	Ubiquitine ligase	DUB (dé-ubiquitylase)	UBD (Ubiquitin Binding)

Tableau 3 : Enzymes et domaines de reconnaissance associés aux principales marques post-traductionnelles des histones. Données tirées de (Bannister and Kouzarides, 2011; Rothbart and Strahl, 2014).

De plus, comme les marques d'histones sont réversibles, le code histone possède une remarquable plasticité nécessaire au bon fonctionnement cellulaire. Par exemple, les histones nouvellement synthétisées possèdent un profil particulier d'acétylation, qui semble favoriser leur import nucléaire, mais une fois incorporées dans la chromatine, notamment au cours de la réplication, ces histones sont dé-acétylées assurant ainsi la maturation de la chromatine répliquée (Alabert et al., 2014; MacAlpine and Almouzni, 2013). La plasticité du code histone permet également une modulation rapide de l'information épigénétique des cellules en cas de changement d'environnement ou en réponse à un stress cellulaire (l'exemple des modifications des histones en réponse aux dommages de l'ADN générés par une irradiation aux UVC sera décrit en partie 3.2).

Cependant, le concept de code histone basé sur la seule combinaison de modifications post-traductionnelles a ses limitations car en l'état actuel des données, il est souvent difficile de prédire l'effet de la perte d'une marque d'histone sur la structure et la fonction de la

chromatine (cf. revues (Rando, 2012; Rothbart and Strahl, 2014)). D'autres éléments contribuent à l'organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine comme la présence symétrique ou asymétrique des modifications au sein de la particule nucléosomale (Voigt et al., 2012) ou l'incorporation de formes variantes d'histones.

2.2.3. Incorporation de variants d'histones

Chez les métazoaires, toutes les protéines histones, à l'exception de H4, se déclinent sous différentes formes protéiques (Franklin and Zweidler, 1977) appelées variants d'histones, (cf. **Tableau 4** & revues (Harshman et al., 2013; Maze et al., 2014; Szenker et al., 2013; Talbert and Henikoff, 2014; Weber and Henikoff, 2014)) qui diffèrent par leur séquence en acides aminés. Les variants d'histones se classent essentiellement en deux catégories, avec d'une part les histones répliquatives, qui représentent la fraction majoritaire des histones synthétisées dans les cellules en prolifération et d'autre part, les histones de remplacement (Wu and Bonner, 1981). Les variants répliquatifs présentent un pic d'expression au cours de la phase S du cycle cellulaire, fournissant ainsi un stock suffisant d'histones incorporées dans la chromatine pendant la réplication, de manière couplée à la synthèse d'ADN (Osley, 1991). A l'opposé, les histones de remplacement sont exprimées et mises en place dans la chromatine indépendamment de la synthèse d'ADN. Elles sont généralement produites en faible quantité tout au long du cycle cellulaire et aussi dans les cellules non prolifératives, comme les cellules différenciées ou en quiescence (Wu et al., 1982). Certains variants d'histones sont également retrouvés presque exclusivement dans certains types cellulaires, notamment dans le sperme (cf. revue (Szenker et al., 2013)).

Outre leur séquence protéique et leur profil d'expression distincts, les variants d'histones sont mis en place dans la chromatine suivant une régulation spatio-temporelle bien définie (**Tableau 4**) qui fait intervenir notamment des chaperons d'histones qui leur sont dédiés (cf. revues (Burgess and Zhang, 2013; Gurard-Levin et al., 2014)). Les chaperons d'histones sont en effet des facteurs cellulaires s'associant aux protéines histones, baptisés ainsi car ils facilitent « l'ensemble des réactions de transfert d'histones tout en ne faisant pas partie intégrante du produit final de la réaction ». Ils assurent donc diverses fonctions dans le métabolisme des histones, comme le stockage, l'incorporation voire l'éviction de ces protéines des nucléosomes. Pouvant reconnaître spécifiquement certains variants par des mécanismes qui restent encore largement inexplorés, les chaperons d'histones permettent donc la mise en place de variants spécifiques dans des régions particulières du génome (**Tableau 4**). Cependant, de nombreuses recherches sont encore nécessaires afin de comprendre comment cette incorporation contribue à coder l'information épigénétique. Un élément à prendre en considération concerne la stabilité différentielle des nucléosomes formés par les variants d'histones *in vivo*, cette stabilité étant importante pour contrôler l'état de

compaction de la chromatine (cf. (Szenker et al., 2013)). Cependant, les différences observées *in vivo* ne sont pas toujours détectables *in vitro*, la divergence de séquence protéique entre variants n'étant pas généralement suffisante pour leur permettre de réguler à eux seuls l'architecture de la chromatine. Des facteurs additionnels sont alors nécessaires comme l'établissement d'interactions spécifiques avec des protéines cellulaires et la mise en place d'un profil de modifications post-traductionnelles propre à chaque variant.

Variant d'histone	Présent chez	Principaux facteurs associés	Distribution dans le génome	Références
Histone H2A				
H2A (réplicatif) <i>15 gènes</i>	Eucaryotes	Chaperons FACT (sous-unité Spt16), NAPI, Nucléoline	Partout	Reuves : (Billon and Côté, 2013; Bönisch and Hake, 2012; Gamble and Kraus, 2010; Gurard-Levin et al., 2014; Weber and Henikoff, 2014)
H2A.X <i>1 gène</i>	Métazoaires	Chaperon FACT	Partout, phosphorylé en présence de dommages de l'ADN	
H2A.Z <i>2 gènes</i>	Eucaryotes	Chaperon ANP32E Complexes p400 et SRCAP	Promoteurs & phases codantes des gènes actifs ou inductibles, éléments de régulation des gènes, nucléoles, centromères	
Macro H2A <i>2 gènes</i>	Amniotes	Chaperon Nucléoline?	Chromosome X inactif, promoteurs des gènes du développement inductibles & à empreinte, nucléoles, centromères, télomères	
H2A.B <i>3 gènes</i>	Mammifères	?	Chromosome X actif, promoteurs & phases codantes des gènes actifs	
Histone H2B				
H2B (réplicatif) <i>17 gènes</i>	Eucaryotes	Tous chaperons de H2A	Partout	Reuves : (Govin and Khochbin, 2013; Shaytan et al., 2015)
H2B.1 <i>1 gène</i>	Mammifères	?	Partout (sperme) Télomères (cellules somatiques)	
H2B.W <i>1 gène</i>	Mammifères	?	Télomères (sperme)	
H2B.E <i>1 gène</i>	Mammifères	?	Partout (neurones olfactifs)	
Histone H3				
H3.1 + H3.2 (réplicatifs) <i>10 + 3 gènes</i>	Métazoaires + Plantes	Chaperons ASF1, CAF-1 (complexe)	Partout	Reuves : (Cui et al., 2015; Filipescu et al., 2014; Gurard-Levin et al., 2014; Hamiche and Shuaib, 2013; Nechemia-Arbely et al., 2012; Szenker et al., 2011) + Annexe 2
H3.3 <i>2 gènes</i>	Eucaryotes	Chaperons ASF1, HIRA (complexe), DAXX (+ATR), DEK	Promoteurs & phases codantes des gènes actifs, éléments de régulation des gènes centromères, télomères	
CENP-A <i>1 gène</i>	Eucaryotes	Chaperon HJURP	Centromères	
H3.Y <i>2 gènes</i>	Primates	?	Euchromatine	
H3.4 <i>1 gène</i>	Mammifères	Chaperon NAP2?	? (sperme) Nucléoles (cellules HeLa)	
H3.5 <i>1 gène</i>	Hominidés	?	Euchromatine (sperme)	
Histone H4				
H4 <i>14 gènes</i>	Eucaryotes	Tous chaperons de H3	Partout	

Tableau 4 : Liste des principaux variants d'histones chez les mammifères. Les variants de l'histone H1 n'ont pas été indiqués. Les données sur le nombre de gènes chez l'homme sont tirées de la revue (Maze et al., 2014). ANP32E: Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 kilodalton E, ATRX: α -thalassemia/mental retardation X-linked, CAF-1: Chromatin Assembly Factor 1, ASF1: Anti Silencing Function 1, CENP-A: Centromere Protein A, DAXX: Death Domain-Associated protein, DEK: Drosophila Eph Kinase homolog, FACT: Facilitates Chromatin Transcription, HIRA: Histone Regulator A, HJURP: Holliday junction recognition protein, NAP: Nucleosome Assembly Protein, NPM1: Nucleophosmin 1, Spt 16: Suppressor of Ty 16 homolog, SRCAP: SWI2/SNF2-related CBP Activator Protein. Tableau adapté de (Szenker et al., 2013).

2.3. Le variant H3.3 : un variant d'histone aux multi-facettes

Dans la partie précédente, je vous ai exposé brièvement les caractéristiques générales des variants d'histones. Je vais maintenant illustrer ces propriétés avec l'exemple de l'histone H3 qui se décline en quatre variants principaux dans les cellules de mammifères (**Tableau 4**) : les variants répliatifs H3.1 et H3.2 et les variants de remplacement H3.3 et CENP-A (ce dernier étant majoritairement incorporé au niveau des centromères et produit en phase G2 du cycle cellulaire) (cf. (Szenker et al., 2013)). Je mettrai plus particulièrement l'accent sur l'histone H3.3, le variant d'histone non centromérique le plus conservé au cours de l'évolution qui, du fait de ces particularités structurales et fonctionnelles par rapport aux variants répliatifs, a été l'objet d'étude principal de ma thèse.

2.3.1. Caractéristiques structurales de H3.3

Tout d'abord, les gènes de l'histone H3.3 diffèrent dans leur organisation dans le génome par rapport aux histones H3.1 et H3.2 (**Figure 13**). En effet, deux gènes uniques *H3F3A* et *H3F3B*, portés par deux chromosomes différents chez la drosophile, la souris et l'homme codent pour la même protéine H3.3 mais avec des séquences non traduites distinctes (Akhmanova et al., 1995; Frank et al., 2003; Krimer et al., 1993). Par contre, les histones répliatives de H3 sont codées par plusieurs copies géniques (10 gènes pour H3.1 + 3 gènes pour H3.2 chez l'homme) (Maze et al., 2014). De plus, ces gènes ne possèdent pas d'introns et sont le plus souvent regroupés en tandem sur un même chromosome (Marzluff et al., 2002). Les ARN messagers issus de la traduction des gènes codant les histones répliatives ont en plus la particularité d'être dépourvus de queue polyadénylée à leur extrémité 3'. Mais ils possèdent une structure tige-boucle et une séquence riche en purines sur lesquelles se fixent respectivement la protéine SLBP (Stem-Loop Binding Protein) et le petit ARN nucléaire U7 snRNP (cf. revue (Marzluff et al., 2008)). L'ensemble de ces caractéristiques structurales assure une production massive d'histones répliatives au cours de la phase S du cycle cellulaire (Osley, 1991). A l'opposé, les ARN messagers issus des gènes de H3.3 sont épissés, poly-adénylés et produits de manière constitutive dans les cellules en prolifération, en quiescence ou différenciées (Frank et al., 2003; Krimer et al., 1993; Wu et al., 1982). Ainsi, la

fraction occupée par H3.3 dans le génome des cellules est variable, dépendante de la présence ou non d'histones répliquatives majoritairement synthétisées dans les cellules en prolifération. Par exemple, le variant H3.3 représente 15% des protéines H3 totales présentes dans les neurones du cortex de rat à la naissance (période où la division de ces neurones s'arrête), tandis que 400 jours après, cette part est de l'ordre de 90% (Piña and Suau, 1987).

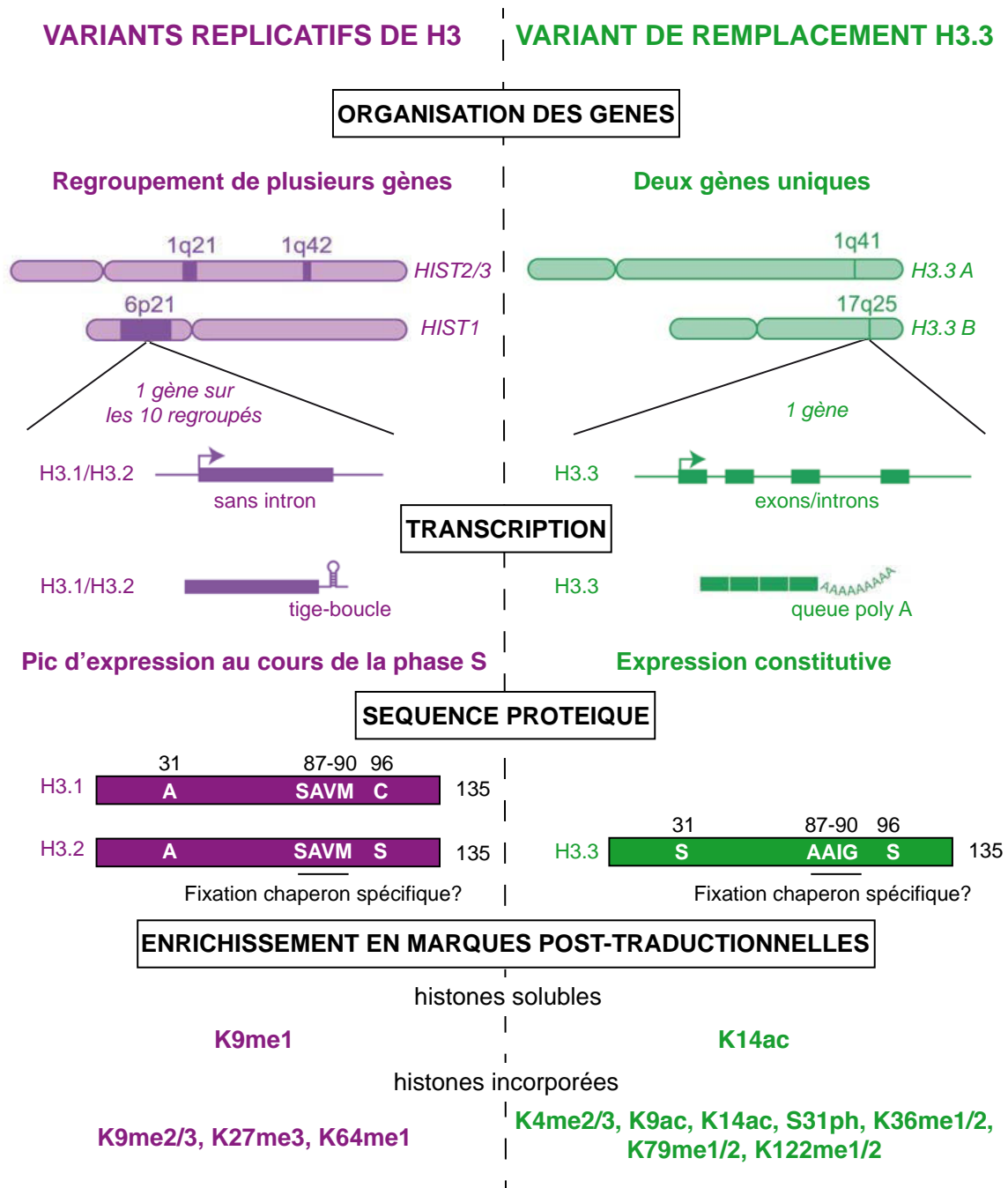


Figure 13 : Principales caractéristiques structurales de H3.3 chez l'homme. H3.3 (en vert) diffère des histones répliquatives H3.1 et H3.2 (en violet) notamment par l'organisation de leurs gènes dans le génome, par les modalités de traduction de leurs ARN messagers, par leur séquence protéique, par leur profil de modifications post-traductionnelles. ac: acétylation, ph: phosphorylation, me: méthylation. Figure adaptée de (Szenker et al., 2011).

Chez les métazoaires, contrairement au variant CENP-A qui a une séquence protéique plus divergente, la protéine H3.3 ne diffère de H3.2 que par quatre acides aminés (dans l'extrémité N-terminale en position 31 et dans le domaine globulaire en positions 87, 89 et 90) et de H3.1 que par cinq acides aminés (position 96 en plus) (**Figure 13**). Ces différences font que les histones H3.1 et H3.3 présentent des profils distincts de migration sur gel acide-urée-triton (Waterborg, 1991). Elles semblent également contrôler les modalités d'incorporation dans le génome des variants réplicatifs (couplée à la synthèse d'ADN) et de H3.3 (mis en place indépendamment de la production d'ADN). Ainsi, dans les cellules de drosophile, substituer un des acides aminés S87, V89 et M90 de l'histone répliquative en A87, I89 ou G90 de l'histone H3.3 est suffisant pour conférer à l'histone répliquative mutée une incorporation indépendante de la synthèse d'ADN (Ahmad and Henikoff, 2002). A l'opposé, chez les plantes, les acides aminés 87 et 90 de H3.3 sont requis pour la mise en place spécifique de ce variant sur l'ADN ribosomal (Shi et al., 2011). Ces résultats montrent que les positions 87-90 sont déterminantes pour spécifier le mode de mise en place des variants de l'histone H3, vraisemblable en facilitant la reconnaissance spécifique d'un variant par son facteur d'assemblage / chaperon d'histone qui lui est propre (cf. partie 2.3.2).

A l'échelle du nucléosome, des données cristallographiques ont révélé que la structure d'une particule nucléosomale formée *in vitro* à partir d'histones H3.3 recombinantes est très similaire à celle obtenue à partir d'histones répliquatives (Tachiwana et al., 2011). Cependant, des nucléosomes contenant H3.3 purifiés à partir de cellules de vertébrés se désorganisent plus facilement que ceux contenant les histones H3 répliquatives en réponse à une augmentation de la concentration en sels dans le milieu (Jin and Felsenfeld, 2007; Jin et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère donc que la différence en acides aminés entre histones répliquatives et H3.3 a un effet modéré et vraisemblablement indirect sur la stabilité des nucléosomes. Néanmoins, dans les expériences *in vitro*, ni la possibilité d'association préférentielle avec des variants de l'histone H2A particuliers (Yukawa et al., 2014) ni les différences de modifications post-traductionnelles entre variants de l'histone H3 ne sont prises en compte. Or, un des acides aminés spécifiques de H3.3, la sérine 31 est phosphorylée au cours de la mitose, et cette modification est retrouvée enrichie dans l'hétérochromatine au niveau des télomères dans les cellules embryonnaires de souris et autour des centromères dans les lignées cellulaires humaines et dans les cellules murines différenciées (Hake et al., 2005; Wong et al., 2009). Mais ce n'est pas le seul acide aminé à être modifié de manière différentielle, puisque les acides aminés conservés entre variants H3.1/H3.2 et H3.3 présentent eux aussi un profil de marques post-traductionnelles globalement distinct (**Figure 13**). Ainsi, le variant H3.3 incorporé présente un enrichissement en modifications d'histones associées à des régions de chromatine transcriptionnellement actives par rapport aux histones répliquatives (Hake et al., 2006; Loyola et al., 2006; McKittrick et al., 2004). Les différences de séquence protéique et de marques post-traductionnelles sont ainsi impliquées dans

l'association préférentielle des variants de l'histone H3 avec des protéines cellulaires, comme ZMNYND11 (Zinc finger MYND-type containing 11) qui, via sa interaction sélective avec H3.3K36me3, régule l'activité transcriptionnelle des gènes (Wen et al., 2014c). De plus, ces distinctions entre variants régulent l'état de compaction de la chromatine car, alors que H3.1 interagit préférentiellement avec la protéine d'hétérochromatine HP1 (Loyola et al., 2006), H3.3 empêche la fixation de l'histone lien H1 sur les nucléosomes contenant ce variant (Braunschweig et al., 2009). Néanmoins, il reste à déterminer si les différences de profil de marques post-traductionnelles entre variants incorporés sont strictement liées à la nature du variant incriminé ou si c'est plutôt l'endroit d'incorporation dans le génome qui est primordial. Conformément à cette dernière hypothèse, les particules nucléosomales contenant H3.1 se trouvant à proximité de celles contenant H3.3 présentent un profil de modifications post-traductionnelles typique de H3.3 (Loyola et al., 2006), ce qui suggère que l'environnement dans lequel les variants d'histones ont été incorporés est un facteur clé contrôlant la mise en place des marques d'histones. Cependant, les histones H3.1 et H3.3 solubles, représentant majoritairement les histones qui n'ont pas encore été incorporées dans la chromatine, présentent également un profil de modifications distinct (**Figure 13**). H3.1 soluble est ainsi enrichi en H3K9me1 (Loyola et al., 2006), ce qui faciliterait la mise en place de la marque d'hétérochromatine H3K9me3 pendant la réplication de l'ADN (cf. revue (MacAlpine and Almouzni, 2013)). Des recherches complémentaires sont nécessaires afin de comprendre comment sont modifiées spécifiquement les variants de l'histone H3, l'interaction avec des chaperons d'histones qui leur sont dédiés représentant un autre élément clé qui influence la mise en place de ces marques.

2.3.2. Incorporation de H3.3 par des chaperons d'histones spécifiques

Les histones H3 sont escortées dans le noyau cellulaire par des chaperons d'histones, propres à un variant particulier ou partagés entre plusieurs variants (cf. revues (Burgess and Zhang, 2013; Gurard-Levin et al., 2014)). Ces chaperons ont été le plus souvent identifiés par analyse comparée de la composition des complexes contenant les variants de H3 solubles, purifiés à partir d'extraits de cellules exprimant des formes étiquetées de H3. Ainsi, le complexe chaperon CAF-1, composé des sous-unités p150, p60 et p48 dans les cellules humaines, s'associe exclusivement avec les histones H3 répliquatives (Latreille et al., 2014; Tagami et al., 2004) mais les mécanismes contrôlant la spécificité d'interaction restent à déterminer. Ce complexe, conservé au cours de l'évolution, assure l'incorporation de variants H3.1 néo-synthétisés couplée à la synthèse d'ADN (**Figure 14**) grâce à sa capacité à interagir directement avec le facteur associé aux ADN polymérases PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Moggs et al., 2000; Ray-Gallet et al., 2011). Pour plus de détails, je vous renvoie aux revues suivantes (Alabert and Groth, 2012; MacAlpine and Almouzni, 2013; Szenker et al., 2013) et à celle que j'ai eu l'opportunité d'écrire sur le sujet (**Annexe 2**).

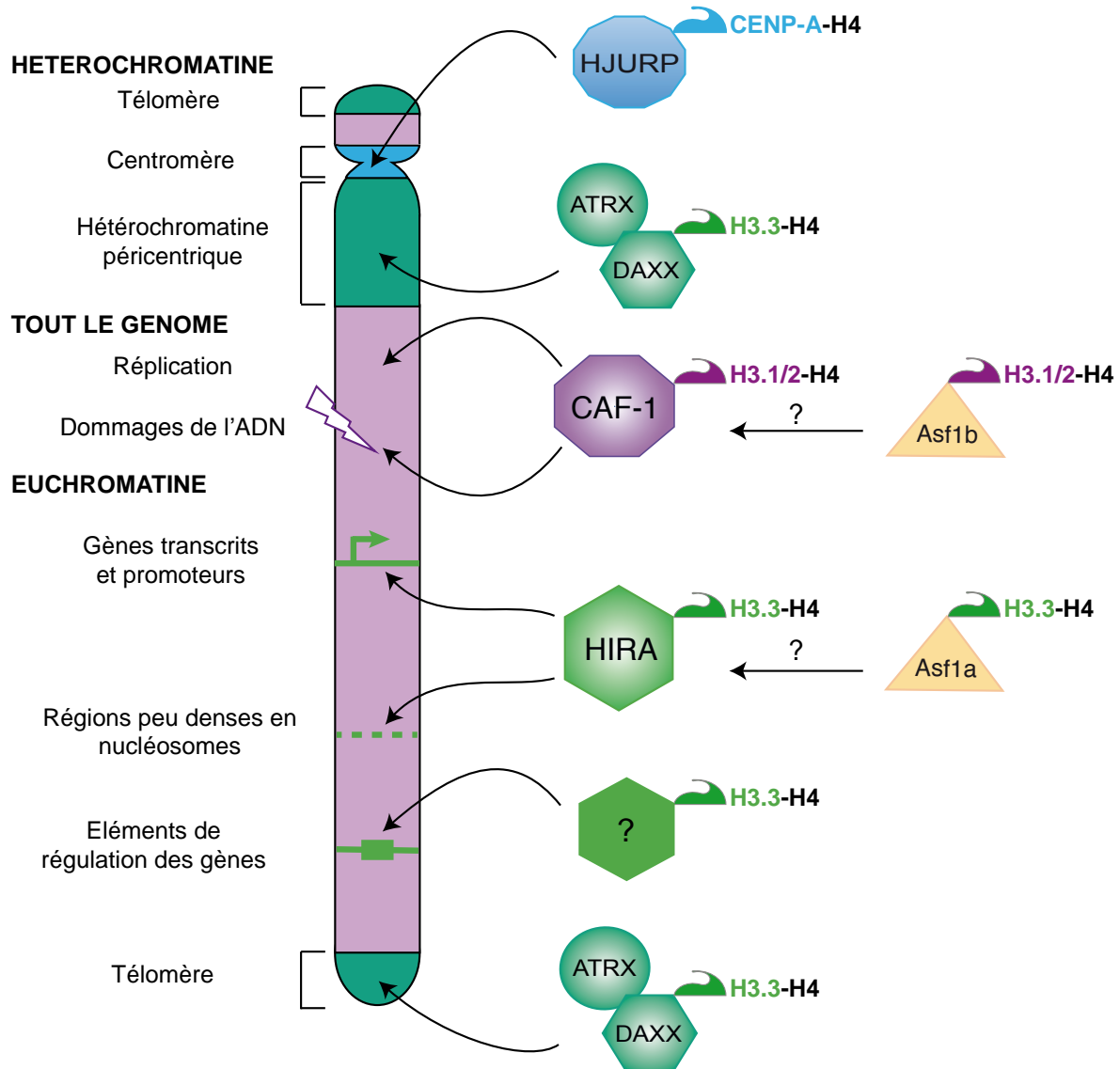


Figure 14 : Modèle de distribution des variants de l'histone H3 dans le génome des mammifères assurée grâce à l'action de chaperons d'histone spécifiques. Dans les cellules murines et humaines, H3.1 (violet) est incorporé de manière couplée à la synthèse d'ADN grâce au complexe chaperon CAF-1 tandis que CENP-A (bleu) est mis en place au niveau des centromères par le chaperon HJURP. Quant à H3.3 (vert), il s'accumule dans les régions codantes transcrites et aux promoteurs des gènes grâce au complexe chaperon HIRA. Alors que HIRA permet l'incorporation de H3.3 dans les régions peu denses en nucléosomes dans les cellules humaines, le chaperon DAXX en association avec le facteur de remodelage ATRX favorise l'accumulation de H3.3 dans l'hétérochromatine des cellules embryonnaires de souris, autour des centromères et aux téломères. A la fois HIRA dans les cellules embryonnaires et DAXX dans les neurones murins ont été impliqués dans l'enrichissement de H3.3 au niveau des éléments de régulation des gènes. Enfin, ASF1 servirait de donneur d'histones pour les complexes CAF-1 et HIRA, avec potentiellement une spécificité apportée par chaque paralogue d'ASF1. Figure adaptée de (Filipescu et al., 2013).

Contrairement aux variants réplicatifs, les histones H3.3 peuvent être prises en charge par le complexe chaperon d'histones HIRA (Ray-Gallet et al., 2011; Tagami et al., 2004). Des expériences de surenroulement de plasmides et d'incorporation de H3.3 sur de l'ADN

immobilisé ont permis d'établir que HIRA assure l'assemblage des nucléosomes de manière indépendante de la synthèse d'ADN *in vitro* (Ray-Gallet et al., 2002; Tagami et al., 2004). La protéine HIRA est conservée au cours de l'évolution (**Figure 15**), présente sous la forme de deux protéines orthologues chez la levure *S. cerevisiae* : Hir1 et Hir2 (cf. revue (Amin et al., 2012)). Des analyses biochimiques de purification ont mis en évidence que ces facteurs forment un complexe chaperon d'histones avec les protéines Hir3 et Hpc2, appelé complexe Hir (Green et al., 2005; Prochasson et al., 2005). Les orthologues de Hir3 et Hpc2 chez l'homme et les plantes, CABIN1 et UBN1/2 respectivement (Balaji et al., 2009; Banumathy et al., 2009) interagissent avec HIRA dans ces espèces (Nie et al., 2014; Tagami et al., 2004), ce qui suggère que le complexe chaperon HIRA est conservé au cours de l'évolution (**Figure 15**). *In vivo*, HIRA contrôle l'incorporation de H3.3 dans la chromatine non couplée à la synthèse d'ADN chez la drosophile (Loppin et al., 2005; Orsi et al., 2013), chez le xénope (Szenker et al., 2012), dans les cellules humaines (Goldberg et al., 2010; Ray-Gallet et al., 2011) et probablement chez les plantes également (Duc et al., 2015; Nie et al., 2014). Cependant, ni les mécanismes contrôlant l'association sélective du complexe chaperon HIRA avec H3.3 ni la contribution exacte de chacune des sous-unités dans l'activité chaperon de ce complexe ne sont actuellement compris (Banumathy et al., 2009; Pchelintsev et al., 2013; Rai et al., 2011; Ray-Gallet et al., 2011; Tang et al., 2012). A l'échelle du génome, le chaperon HIRA est requis pour l'enrichissement de H3.3 au niveau des promoteurs et de certains éléments de régulation du génome. Il permet de plus l'incorporation de ce variant d'histone dans les régions codantes, de manière corrélée au taux d'expression des gènes dans les cellules humaines et murines (Goldberg et al., 2010; Ray-Gallet et al., 2011) (**Figure 14 & Tableau 5** pour plus de détails sur la mise en place de H3.3 chez d'autres organismes). Ce lien entre l'incorporation de H3.3 par HIRA et la transcription est renforcé par le fait que HIRA co-immunoprécipite avec l'ARN polymérase II (Ray-Gallet et al., 2011). HIRA assure aussi la mise en place du variant H3.3 associée à la transcription des gènes dans la chromatine de cellules sénescentes (Rai et al., 2014). Mais le complexe chaperon HIRA facilite aussi l'incorporation de H3.3 dans d'autres contextes cellulaires. En effet, le suivi spécifique d'histones H3.3 néo-synthétisées dans des cellules humaines grâce au système de marquage SNAP a permis de dévoiler que de nouvelles histones H3.3 sont incorporées aux sites de réplication de l'ADN quand les cellules ont une expression diminuée de CAF-1 (cellules incapables de mettre en place des variants répliatifs à ces sites (Ray-Gallet et al., 2011)). Combiné au fait que HIRA a la capacité de fixer l'ADN *in vitro* et que la perte d'expression de HIRA conduit à une hyper-sensibilité de la chromatine à une digestion MNase (Micrococcal Nuclease), ces données suggèrent que HIRA favoriserait la mise en place de H3.3 dans les régions génomiques devenues pauvres en nucléosomes (**Figure 14**). Ce rôle de HIRA dans le maintien de l'intégrité de la structure de la chromatine dans les cellules humaines serait également présent chez la drosophile (Schneiderman et al., 2012).

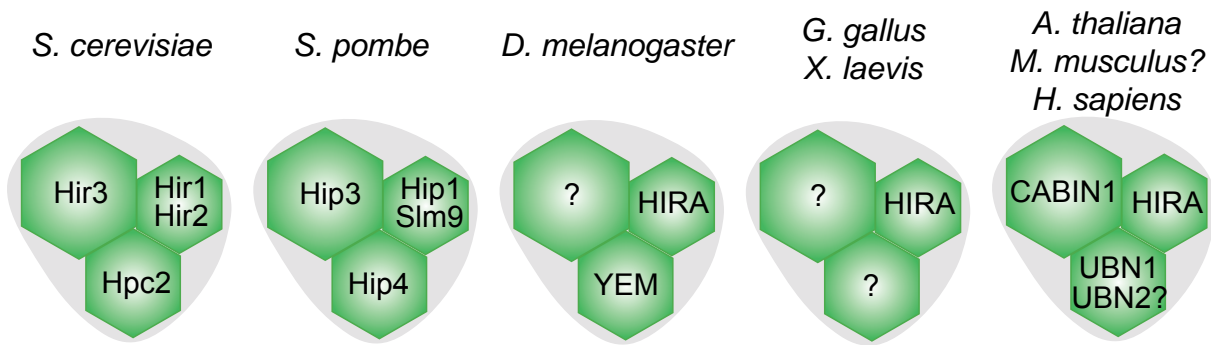


Figure 15 : Conservation du complexe chaperon HIRA entre organismes. Chez l'homme et les plantes, le complexe HIRA est composé des protéines HIRA, UBN (Ubinuclein) et CABIN1 (Calcineurin Binding Protein 1). Contrairement à UBN1, le rôle d'UBN2, protéine orthologue à Hpc2 n'a pas encore été clarifié dans la littérature. Un complexe similaire se formerait dans les cellules murines, mais aucune étude n'a encore caractérisé le complexe HIRA dans ces cellules. L'activité du facteur HIRA est partagée entre deux protéines chez la levure, et pour l'instant, aucun orthologue de UBN et CABIN1 chez le xénope et le poulet et aucun orthologue de CABIN1 chez la drosophile n'a été identifié. Hip: HIRA interacting protein, Hir: Histone regulation, Hpc2: Histone periodic control 2, Slm9: Synthetic lethal mutant 9, YEM: Yemanuclein. Données tirées de la revue (Amin et al., 2012).

De plus, l'analyse des facteurs associés spécifiquement au variant H3.3 soluble a permis de démontrer que le chaperon DAXX, en complexe avec le facteur de remodelage ATRX (facteur SNF2-like) (Xue et al., 2003), interagit de manière sélective avec H3.3 dans les cellules humaines et murines (Drané et al., 2010; Goldberg et al., 2010; Lewis et al., 2010). Des études structurales, biophysiques et biochimiques ont apporté la preuve que la sélectivité de DAXX pour H3.3 repose sur les acides aminés spécifiques de H3.3, A87 et G90 en particulier (Elsässer et al., 2012; Liu et al., 2012). Ces derniers favoriseraient une stabilisation de l'organisation tridimensionnelle du variant et de son chaperon associé (Denizio et al., 2014). DAXX assure l'incorporation de H3.3 au sein de nucléosomes *in vitro* (Drané et al., 2010; Lewis et al., 2010). *In vivo*, le complexe DAXX/ATRX facilite l'accumulation de H3.3 au niveau des télomères des cellules ES (Embryonic Stem) de souris (Goldberg et al., 2010; Lewis et al., 2010) et dans l'hétérochromatin péricentrique de fibroblastes humains et embryonnaires murins (Corpet et al., 2013; Drané et al., 2010) (**Figure 14**). Cependant, il n'est pas encore clairement établi dans la littérature si le complexe DAXX/ATRX favorise directement l'incorporation de H3.3 dans ces régions ou s'il possède une fonction plus indirecte. En effet, des données récentes ont révélé que DAXX est requis pour l'accumulation de nouvelles histones H3.3 au niveau des corps nucléaires PML (Promyelocytic Leukemia), ce qui permettrait d'orienter la mise en place de ces variants dans certaines régions du génome (Corpet et al., 2013; Delbarre et al., 2013). Un des facteurs clés régulant cette orientation serait la protéine DEK, dont l'activité chaperon sur H3.3 a été initialement dévoilée chez la drosophile (Sawatsubashi et al., 2010). En effet, une diminution d'expression de DEK dans les cellules murines conduit à une redistribution de H3.3, avec

perte d'enrichissement au niveau des télomères, et gain dans le reste du génome (bras chromosomiques et autour des centromères, (Ivanauskiene et al., 2014)). Enfin, le chaperon DAXX est aussi impliqué dans l'incorporation de H3.3 au niveau d'éléments de régulation de gènes après activation de neurones de cortex murins (Michod et al., 2012) et dans la délocalisation de CENP-A en dehors des centromères dans les cellules humaines sur-exprimant ce variant de H3 (Lacoste et al., 2014). Le complexe DAXX/ATRX pourrait donc contribuer différemment à la dynamique de H3.3 en fonction du type cellulaire.

L'analyse biochimique de la composition des complexes contenant les histones solubles H3.1, H3.2 et H3.3 a finalement révélé que ces trois variants de H3 interagissent avec les chaperons NASP (Nuclear Autoantigenic Sperm Protein) et ASF1 (Latreille et al., 2014; Tagami et al., 2004). Alors que NASP assure le maintien d'un stock d'histones solubles en empêchant leur dégradation par autophagie (Cook et al., 2011), ASF1 escorterait les histones H3-H4 de concert avec MCM2 (minichromosome maintenance complex component 2, membre du complexe hélicase impliqué dans la réplication de l'ADN) (Groth et al., 2007a, Richet et al., 2015) et servirait de donneur d'histones aux complexes chaperons CAF-1 et HIRA (**Figure 14**) (cf. revue (Gurard-Levin et al., 2014)). En effet, des données cristallographiques ont montré que ASF1 interagit avec ces chaperons d'histones de manière mutuellement exclusive au niveau d'un site hydrophobe commun (Malay et al., 2008; Tang et al., 2006) et ASF1 est requis pour une progression normale du cycle cellulaire chez la levure et dans les cellules humaines (Groth et al., 2007a; Tyler et al., 1999). De plus, ASF1 entre en compétition avec DAXX pour la fixation de H3-H4 (Elsässer et al., 2012). Alors que chez la levure, il n'existe qu'une seule protéine ASF1, les mammifères possèdent deux paralogues fonctionnellement non équivalents, ASF1a et ASF1b, présentant des profils d'expression cellulaires distincts (Corpet et al., 2011). Des analyses biochimiques ont en plus déterminé que ASF1a interagit sélectivement avec HIRA *in vitro* et *in vivo* (Abascal et al., 2013; Daganzo et al., 2003; Tang et al., 2006), tandis que ASF1b s'associe préférentiellement avec CAF-1 p60 *in vivo* (Abascal et al., 2013), ce qui permettrait à ASF1 de donner spécifiquement un variant particulier de H3 au complexe chaperon qui lui est propre. Cependant, des recherches additionnelles sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent cette répartition des tâches entre les paralogues d'ASF1.

En conclusion, les mécanismes d'incorporation du variant de remplacement H3.3 sont de mieux en mieux connus, et font intervenir un réseau de chaperons d'histones dont l'action est coordonnée. Ces connaissances ont permis la réalisation de nombreuses études sur l'impact de la perte d'incorporation de H3.3 dans divers organismes. Ces études ont alors conduit à des avancées majeures dans notre compréhension de l'importance fonctionnelle du variant d'histone H3.3 et de ses chaperons associés, que je vais maintenant vous illustrer.

2.3.3. Importance fonctionnelle de H3.3 et de ses chaperons associés

Le variant d'histone H3.3 est le variant de H3 non centromérique le plus conservé au cours de l'évolution. Alors que la levure ne possède qu'un seul type de variant H3 non centromérique appelé H3 ou H3.3-like, les organismes des ciliés aux primates en possèdent au moins deux (pour plus de détails, cf. revue (Szenker et al., 2011)). La perte d'expression de H3.3 et/ou de ses chaperons dédiés conduit à des phénotypes plus ou moins sévères en fonction de l'organisme étudié (**Tableau 5**). Par exemple, alors que chez la souris et le xénope, la perte d'expression de HIRA est létale (Roberts et al., 2002; Szenker et al., 2012), ce n'est pas le cas chez la levure, la drosophile et la plante *Arabidopsis* (Amin et al., 2012; Bonnefoy et al., 2007; Ingouff et al., 2010). Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces différences. D'une part, la mise en place de H3.3 peut être en partie compensée par l'incorporation d'un autre variant de l'histone H3, comme c'est le cas chez la drosophile (Hödl and Basler, 2012). D'autre part, d'autres facteurs de la dynamique de la chromatine sont susceptibles de prendre le relais en cas de défaillance du complexe HIRA. Ainsi, chez la levure *S. cerevisiae*, la voie CAF-1 compense la perte de la voie HIR pour assurer le maintien de la répression transcriptionnelle dans l'hétérochromatine (Kaufman et al., 1998; Qian et al., 1998). Chez la drosophile, le complexe chaperon HIRA et le facteur de remodelage de la chromatine XNP (X-linked nuclear protein), homologue d'ATRX chez les mammifères, assurent l'incorporation de H3.3 dans les chromosomes polytènes (Schneiderman et al., 2012).

Cependant, chez tous ces organismes, l'incorporation de H3.3 est associée à la fois à de l'activation et à de la répression de l'expression génique (**Tableau 5**). Alors que le rôle du complexe chaperon HIR dans le maintien de l'hétérochromatine transcriptionnellement silencieuse est assez bien documenté chez la levure (cf. revue (Amin et al., 2012)), le rôle de la mise en place de H3.3 par les complexes HIRA et/ou DAXX/ATRX dans le maintien de la répression des gènes fait l'objet de débat, ces complexes pouvant être associés à de l'activation ou de l'inhibition transcriptionnelle en fonction de l'espèce et du tissu étudiés (**Tableau 5**). Le niveau de densité d'histones incorporées et/ou le type de marques post-traductionnelles portées par H3.3 dans les différentes régions du génome pourraient être des facteurs clés de cette spécification, même si des données complémentaires sont nécessaires afin de mieux déterminer le rôle de H3.3 associé à l'inhibition ou à l'activation de la transcription.

Facteur	Processus	Rôle au sein de l'organisme	Références
<i>S. cerevisiae</i>			
HIR	Expression génique	Le complexe HIR réprime l'expression de gènes codant pour les histones	(Osley and Lycan, 1987; Xu et al., 1992)
		La voie HIR assure le maintien de l'hétérochromatine en absence de la voie CAF	(Kaufman et al., 1998)
		Létalité synthétique entre mutants du complexe HIR et facteurs d'élongation de la transcription, accumulation de HIR sur le gène <i>GALI</i> après induction de son expression	(Formosa et al., 2002; Nourani et al., 2006)
		Le complexe HIR inhibe la formation d'ARN cryptiques	(Cheung et al., 2008; Nourani et al., 2006)
	Intégrité du génome	Les voies CAF et HIR se compensent pour empêcher la rétro-transposition des éléments Ty	(Qian et al., 1998)
		Instabilité chromosomique et hypersensibilité à l'agent alkylant MMS des mutants combinés des voies CAF et HIR	(Kaufman et al., 1998; Qian et al., 1998; Sharp et al., 2002)
Espérance de vie plus longue en absence du complexe HIR		(Feser et al., 2010)	
<i>S. pombe</i>			
HIR	Expression génique	Hip1 réprime l'expression de gènes codant pour les histones	(Blackwell et al., 2004)
		Le complexe HIR est requis pour le maintien de l'hétérochromatine et l'inhibition de l'expression des rétro-transposons Tf2	(Anderson et al., 2010; 2009; Blackwell et al., 2004; Greenall et al., 2006; Yamane et al., 2011)
		Le complexe HIR inhibe la formation d'ARN cryptiques	(Anderson et al., 2009; Yamane et al., 2011)
		Hip1 est important pour maintenir l'architecture nucléosomale à la fois dans les régions d'euchromatine et d'hétérochromatine	(Gal et al., 2015)
		Le complexe HIR assure l'expression des gènes de stress induits par choc thermique	(Chujo et al., 2012)
	Intégrité du génome	Hypersensibilité des levures aux agents de dommages de l'ADN camptothécine, zéocine et MMS après perte de Hip1/3 ou Slm9	(Anderson et al., 2009)
		Hypersensibilité des levures aux UVC après perte de Slm9 (pas de Hip1)	(Blackwell et al., 2004; Kanoh and Russell, 2000)
Instabilité chromosomique en l'absence du complexe HIR		(Blackwell et al., 2004; Greenall et al., 2006)	
<i>A. thaliana</i>			
H3.3	Expression génique	Accumulation de H3.3 sur l'ADN ribosomal + dans les régions codantes des gènes transcrits corrélés à l'activité de transcription + aux promoteurs quel que soit le statut d'expression du gène	(Shi et al., 2011; Shu et al., 2014; Stroud et al., 2012; Wollmann et al., 2012)
HIRA	Expression génique	HIRA est requis pour le maintien de la répression du gène homéotique <i>knox</i> et de gènes présents dans l'hétérochromatine	(Duc et al., 2015; Phelps-Durr et al., 2005)
		HIRA régule l'expression des gènes de stress	(Nie et al., 2014)
	Fertilité	Défaut de fertilité en absence du complexe HIRA (<i>données contradictoires</i>)	(Duc et al., 2015; Ingouff et al., 2010; Nie et al., 2014)
	Embryogénèse	Pas de défaut majeur des étapes précoces d'embryogénèse en absence du complexe HIRA	(Ingouff et al., 2010; Nie et al., 2014)
	Organo-génèse	Défauts de développement des feuilles, des fleurs et des racines en absence du complexe HIRA	(Nie et al., 2014; Phelps-Durr et al., 2005)
Pluripotence	HIRA est requis pour la différenciation	(Nie et al., 2014)	

Facteur	Processus	Rôle au sein de l'organisme	Références
<i>D. melanogaster</i>			
H3.3	Spermato-génèse	Défaut de fertilité chez le mâle en absence de H3.3 (pas de défaut quand H3.2 est exprimé à partir du promoteur de H3.3)	(Hödl and Basler, 2009; 2012)
		Défaut de méiose et de remodelage de la chromatine post méiose en l'absence de H3.3	(Sakai et al., 2009)
	Ovogénèse	Défaut de fertilité chez la femelle en absence de H3.3	(Hödl and Basler, 2009; Sakai et al., 2009)
	Embryo-génèse	Pas de défaut majeur du développement jusque l'adulte en absence de H3.3	(Hödl and Basler, 2009)
	Organo-génèse	Chez les drosophiles mutantes pour dBRWD3, la hausse du niveau de H3.3 incorporé perturbe le profil d'expression des gènes neuronaux et la différenciation des organes sensoriels	(Chen et al., 2015)
HIRA	Spermato-génèse	HIRA n'est pas requis pour la fertilité chez le mâle	(Bonnefoy et al., 2007)
	Fécondation	Incorporation globale de H3.3 dans le génome paternel assurée par le complexe HIRA	(Bonnefoy et al., 2007; Loppin et al., 2005; Orsi et al., 2013)
	Embryo-génèse	Pas de défaut majeur du développement jusque l'adulte en absence de HIRA, mais mortalité du double mutant HIRA/XNP (orthologue d'ATRX)	(Bonnefoy et al., 2007; Schneiderman et al., 2012)
	Organo-génèse	L'inactivation de YEM sauve le phénotype des drosophiles mutantes pour dBRWD3	(Chen et al., 2015)
<i>G. gallus</i>			
H3.3	Expression génique	Les cellules DT40 ayant perdu toute expression de H3.3 présentent un changement de profil d'expression des gènes	(Frey et al., 2014)
	Intégrité du génome	Hypersensibilité des cellules DT40 aux agents de dommages de l'ADN, cisplatine, MMS et UVC après perte de H3.3	(Frey et al., 2014)
HIRA	Embryo-génèse	Malformations cardiaques après diminution d'expression de HIRA dans le pli neural d'œufs	(Farrell et al., 1999)
<i>X. laevis</i>			
H3.3	Expression génique	H3.3K4 est requis pour le maintien de la mémoire de l'activité transcriptionnelle de gènes myogéniques au cours des divisions cellulaires	(Ng and Gurdon, 2008)
	Embryo-génèse	Défaut dans les étapes tardives de la gastrulation et dans l'induction mésodermique en l'absence de H3.3	(Lim et al., 2013; Szenker et al., 2012)
HIRA	Embryo-génèse	Défaut dans les étapes tardives de la gastrulation et dans l'induction mésodermique en l'absence de HIRA	(Szenker et al., 2012)
	Pluripotence	L'incorporation de H3.3 dépendante de HIRA facilite l'induction des gènes de pluripotence après reprogrammation par transfert nucléaire	(Jullien et al., 2012)
<i>M. musculus</i>			
H3.3	Spermato-génèse	Défaut de fertilité des souris mâles <i>H3F3A</i> ^{-/-} & <i>H3F3B</i> ^{-/+}	(Bush et al., 2013; Couldrey et al., 1999; Tang et al., 2015; 2013; Yuen et al., 2014)
		Accumulation de H3.3 niveau du corps XY des spermatocytes pendant le MSCI	(van der Heijden et al., 2007)
	Ovogénèse	Pas de défaut de fertilité chez les souris femelles <i>H3F3A</i> ^{-/-} mais mortalité précoce de l'oocyte en cas d'inactivation simultanée de <i>H3F3A</i> et <i>H3F3B</i> au début de la folliculogénèse	(Tang et al., 2015)
	Fécondation	Enrichissement de H3.3 dans la chromatine paternelle pendant la formation du pronucléus	(van der Heijden et al., 2005)
La fécondation induit une perte de l'accumulation de H3.3 maternel		(Akiyama et al., 2011)	

Facteur	Processus	Rôle au sein de l'organisme	Références
M. musculus			
H3.3	Embryo-génèse	H3F3A ^{-/-} : viabilité ou mortalité partielle à la naissance en fonction de la stratégie utilisée H3F3B ^{-/-} : létalité partielle ou complète à la naissance en fonction de la stratégie utilisée H3F3B ^{-/+} : défaut de croissance	(Bush et al., 2013; Couldrey et al., 1999; Tang et al., 2013; 2015)
	Pluripotence	Baisser le niveau de H3.3 dans l'oocyte conduit à un défaut de reprogrammation et d'induction des gènes de pluripotence après transfert nucléaire	(Wen et al., 2014b)
HIRA	Spermato-génèse	Accumulation de HIRA au niveau du corps XY des spermatoocytes pendant le MSCI	(van der Heijden et al., 2007)
	Fécondation	Enrichissement de HIRA dans la chromatine paternelle pendant la formation du pronucléus	(van der Heijden et al., 2005)
		HIRA maternel est nécessaire au développement du zygote	(Lin et al., 2014)
	Embryo-génèse	HIRA ^{-/-} : mortalité à E10-E11 (défaut de gastrulation)	(Roberts et al., 2002)
	Pluripotence	Pas de défaut de renouvellement des cellules ES en absence de HIRA mais après différenciation, importance de l'incorporation de H3.3 (sûrement par HIRA) afin de définir l'identité cellulaire	(Banaszynski et al., 2013; Goldberg et al., 2010)
		Accumulation de HIRA dans le noyau des cellules germinales primordiales en cours de reprogrammation	(Hajkova et al., 2008)
	Organo-génèse	La mise en place de H3.3 par HIRA (sûrement aidée par le facteur de remodelage CHD2) active la transcription des gènes myogéniques ou ostéogéniques au cours de la différenciation de myoblastes en myotubes ou ostéoblastes	(Harada et al., 2012; Song et al., 2012; Yang et al., 2011b)
CABIN1 empêche l'activation du gène myogénique <i>Mef2</i> par HIRA dans les myoblastes mais cette inhibition est levée au cours de la différenciation par perte d'expression de CABIN1		(Yang et al., 2011a)	
Expression génique	WHSC1 active l'expression des gènes de réponse à l'interféron (en contrôlant l'incorporation de H3.3 par HIRA?)	(Sarai et al., 2013)	
Oncogénèse	Développement précoce de papillomes chez les souris exprimant l'allèle oncogénique de <i>Braf</i> et ayant perdu l'expression de HIRA dans l'épiderme	(Rai et al., 2014)	
DAXX/ ATRX	Spermato-génèse	Accumulation de DAXX au niveau du corps XY des spermatoocytes pendant le MSCI	(Rogers et al., 2004)
	Expression génique	Dans les cellules ES, ATRX assure le maintien de l'hétérochromatine silencieuse au niveau des allèles éteints de gènes à empreinte, par contrôle de l'accumulation de H3.3 à ces sites	(Voon et al., 2015)
	Embryo-génèse	DAXX ^{-/-} : mortalité à E9.5 (défaut de différenciation)	(Michaelson et al., 1999)
		ATRX ^{-/-} : mortalité à E9.5 (défaut de formation du trophoblaste extra-embryonnaire)	(Garrick et al., 2006)
	Organo-génèse	Incorporation de H3.3 par DAXX au niveau d'éléments de régulation du génome facilite l'induction des gènes neuronaux après activation de neurones corticaux	(Michod et al., 2012)
		Défaut de survie des neurones corticaux au cours des étapes précoces de la différenciation en absence de ATRX, sûrement à cause d'une perte de l'intégrité des télomères et de l'hétérochromatine péricentrique	(Bérubé et al., 2005; Ritchie et al., 2008; Watson et al., 2013)
		Activation de l'expression de l'ARN TERRA en absence d'ATRX (données contradictoires selon type cellulaire)	(Goldberg et al., 2010; Levy et al., 2015)
ATRX est requis pour inhiber la transcription des ARN centromériques après activation des cellules neuronales		(Noh et al., 2014)	
	ATRX favoriserait l'élongation de la transcription à travers les régions du génome riches en guanine dans le cerveau	(Levy et al., 2015)	

Tableau 5 : Rôle de H3.3 et de ses chaperons associés chez divers organismes.

L'importance de H3.3 dans l'activation et la répression de la transcription ont été surlignées en vert et rouge respectivement. BRWD3: Bromodomain and WD repeat Domain containin 3, MMS: methyl methanesulfonate, MSCI: Inactivation Méiotique des Chromosomes Sexuels, WHSC1: Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1. Pour plus de détails, je vous renvoie aux revues (Amin et al., 2012; Filipescu et al., 2014).

Le fait que H3.3 se retrouve généralement enrichi dans les régions transcrites du génome (Ahmad and Henikoff, 2002; Chow et al., 2005; Daury et al., 2006; Delbarre et al., 2010; Goldberg et al., 2010; Mito et al., 2005; Schwartz and Ahmad, 2005; Stroud et al., 2012; Wirbelauer et al., 2005; Wollmann et al., 2012) a longtemps été considéré comme révélant un rôle passif de H3.3, compensant l'éviction d'histones due à la progression de l'ARNPII sur les gènes activement transcrits (cf. revue (Saade et al., 2015)). En accord avec cette idée, la mise en place de H3.3 ne semble pas forcément indispensable pour maintenir un niveau basal de transcription comme par exemple dans les cellules ES murines, où la perte d'expression de HIRA n'induit pas de changement conséquent du transcriptome de ces cellules (Goldberg et al., 2010). Néanmoins, des données récentes suggèrent une fonction plus active de H3.3. Ainsi, l'incorporation de ce variant de H3 dans les régions transcrites pourrait servir de système de marquage de la chromatine qui assurerait une mémoire épigénétique d'un état préalablement actif du génome. Conformément à cette hypothèse, des expériences de transfert nucléaire chez le xénope et la souris ont démontré que H3.3 est requis pour la reprogrammation cellulaire et l'induction des gènes de pluripotence (Jullien et al., 2012; Ng and Gurdon, 2008; Wen et al., 2014a) et chez *Arabidopsis*, le chaperon HIRA est nécessaire à la dé-différentiation des cellules (Nie et al., 2014). De plus, l'incorporation de H3.3 par ses chaperons spécifiques au niveau des gènes de différenciation ou de réponse au stress semble permettre aux cellules de l'organisme de s'adapter à leur environnement, en particulier dès qu'un changement de profil d'expression génique est requis. Ce rôle a notamment été révélé après traitement à l'interféron de cellules murines (Sarai et al., 2013; Tamura et al., 2009), après infection virale dans les cellules humaines (Placek et al., 2009), après choc thermique chez la drosophile et la levure (Chujo et al., 2012; Schneiderman et al., 2012; Schwartz and Ahmad, 2005), après activation neuronale chez la souris (Michod et al., 2012; Noh et al., 2014), pendant la différenciation des cellules ES et myoblastes murins (Banaszynski et al., 2013; Harada et al., 2012; Majumder et al., 2015; Song et al., 2012; Yang et al., 2011a; 2011b) et au cours du développement embryonnaire du xénope (Lim et al., 2013; Szenker et al., 2012).

Chez l'homme, l'importance de H3.3 et de ses chaperons a été mise en évidence grâce à l'existence de mutations de ces facteurs, qui conduisent à des phénotypes sévères. Ainsi, HIRA est l'un des gènes candidats identifié dans la micro-délétion du chromosome 22q11.2 responsable du syndrome de DiGeorge (ou syndrome Velocardiofacial) (Halford et al., 1993;

Lamour et al., 1995). Cette anomalie chromosomique congénitale se caractérise par des malformations cardiaques, une dysmorphie faciale, un retard de développement et une immunodéficience (Schinke and Izumo, 1999). Cependant, l'étude des modèles murins et de poulet de cette maladie suggère que ce n'est pas la perte de HIRA seule mais celle de l'ensemble des gènes contenus dans la délétion qui est responsable du phénotype des patients (Hierck et al., 2004; Lindsay et al., 1999). La perte de fonction d'ATRX conduit quant à elle à différents symptômes dont une α -thalassémie légère (maladie du sang caractérisée par une réduction d'expression des gènes de globines situés à proximité du chromosome 16, cf. revue (Clynes et al., 2013)). De plus, des mutations dans le facteur de remodelage ATRX et/ou dans le chaperon d'histone DAXX ont été identifiées dans différents types de cellules cancéreuses humaines, qui ont presque toutes la particularité d'utiliser la voie ALT (allongement des télomères par recombinaison homologue) pour maintenir l'intégrité structurale de leurs télomères (cf. revues (Clynes et al., 2013; Filipescu et al., 2014)). Il serait donc intéressant de déterminer l'impact de ces mutations sur la capacité que possède le complexe DAXX/ATRX à enrichir H3.3 dans certaines régions du génome afin de mieux comprendre la contribution éventuelle de ces mutations dans la tumorigénèse.

2.3.4. Mutations ponctuelles de H3.3 et leur potentiel oncogénique

En plus des chaperons d'histones, l'histone H3 a été aussi retrouvée fréquemment mutée dans différents types de cancers affectant le système nerveux central et les tissus squelettiques (**Figure 16** et revues (Kallappagoudar et al., 2015; Yuen and Knoepfler, 2013) pour plus de détails concernant la pénétrance et les caractéristiques phénotypiques de ces tumeurs). Les mutations faux-sens identifiées à ce jour affectent seulement trois acides aminés situés dans la queue N-terminale de H3, extrémité qui est le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles (cf. partie 2.2.2). Les gènes majoritairement mutés sont ceux codant pour l'histone de remplacement H3.3 (*H3F3A* et *H3F3B*), mais dans certains cas, des gènes codant pour le variant répliatif H3.1 (*HIST1H3B* et *HIST1H3C*) peuvent être également modifiés. Ces mutations ponctuelles de l'histone H3 diffèrent en fonction de l'âge des patients, du type et de la localisation de la tumeur (Behjati et al., 2013; Buczkowicz et al., 2014; Fontebasso et al., 2014; Gielen et al., 2013; Khuong-Quang et al., 2012; Schwartzenuber et al., 2012; Sturm et al., 2012; Taylor et al., 2014; Wu et al., 2012; 2014).

L'effet tumorigène de ces mutations peut s'expliquer, au moins en partie, parce qu'elles affectent le profil de marques post-traductionnelles des histones H3 au sein des tissus atteints. En effet, les acides aminés K27 et K36 de l'histone H3, mutés dans certaines tumeurs, sont les cibles de diverses modifications chimiques, étant associés à l'activation ou à l'inhibition de la transcription (**Figure 12**). Non seulement ces résidus ne peuvent plus être modifiés sur les histones porteuses de la mutation mais les histones non mutées sont aussi

susceptibles de ne plus être ciblées par les enzymes de modification des histones, comme c'est le cas suite à la mutation K27M. Il a été ainsi démontré que cette mutation a un effet dominant négatif, car elle perturbe la mise en place de la marque H3K27me3 sur les histones H3 sauvages (Bender et al., 2013; Chan et al., 2013; Lewis et al., 2013; Venneti et al., 2013). Le blocage de l'activité méthylase de PRC2 (Polycomb Group Repressive Complex 2) par stabilisation de l'interaction entre cette enzyme et l'histone mutée K27M est le mécanisme d'action actuellement privilégié dans la littérature pour expliquer la diminution globale du niveau de H3K27me3 (Lewis et al., 2013). Cette modification post-traductionnelle d'histone étant associée à la répression transcriptionnelle, sa perte conduirait à la tumorigénèse par modification des programmes d'expression génique des cellules. L'introduction d'une mutation sur un site proche d'un acide aminé normalement porteur d'une marque d'histone peut également perturber la modification post-traductionnelle de ce dernier. Conformément à cette hypothèse, les histones H3.3 mutées sur leur résidu G34 présentent un taux réduit de di- et tri-méthylation de l'acide aminé voisin K36 et une dérégulation de l'expression de l'oncogène *MYCN* (Bjerke et al., 2013; Lewis et al., 2013). Mais contrairement à K27M, la mutation de G34V/R n'altère pas de manière significative le niveau global de H3K36me2/me3 dans les cellules.

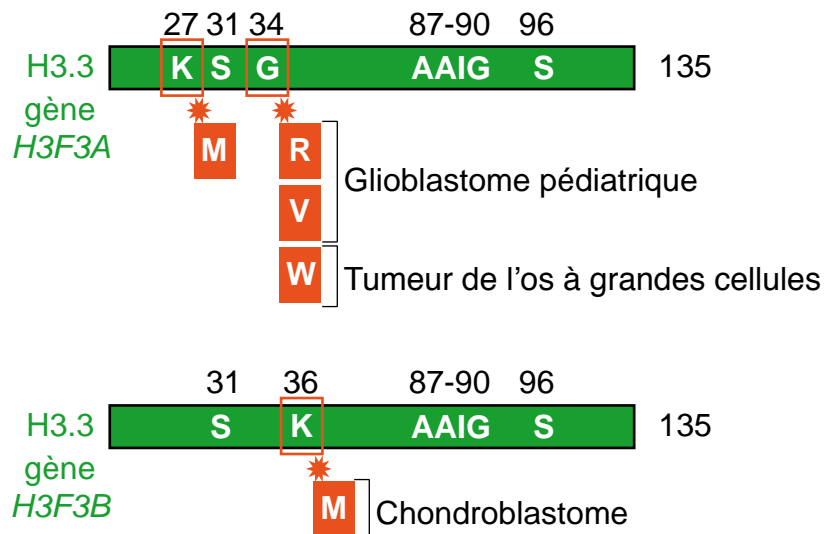


Figure 16 : Principales mutations ponctuelles de H3.3 associées à des cancers humains. Chaque mutation est associée à un type de cancer distinct, affectant soit les tissus cérébraux, osseux et cartilagineux. Données tirées des revues (Kallappagoudar et al., 2015; Yuen and Knoepfler, 2013).

Enfin, il est fort probable que des altérations des programmes d'expression génique ne soient pas le seul mécanisme expliquant le potentiel oncogénique des mutations de l'histone H3.3. En effet, une des caractéristiques des cellules cancéreuses est leur dépendance vis à vis de certaines voies de réparation de l'ADN. Perturber le profil de modifications post-traductionnelles des histones pourrait renforcer cette dépendance, même si des données

complémentaires sont nécessaires pour confirmer ou infirmer cette idée. Conformément à cette hypothèse, des études récentes ont démontré que la méthylation de H3K36, marque d'histone dont le niveau est altéré dans les tumeurs, active préférentiellement certaines voies de réponse aux dommages de l'ADN (après cassures double brin de l'ADN et mésappariements) (Aymard et al., 2014; Carvalho et al., 2014; Jha and Strahl, 2014; Li et al., 2013; Pai et al., 2014; Pfister et al., 2014).

En conclusion, même si la chromatine peut apparaître au premier abord comme une succession de « perles nucléosomales équivalentes », il s'agit en fait d'un filament nucléoprotéique très hétérogène. Chaque nucléosome possède des caractéristiques uniques qui sont le résultat d'une combinaison singulière de formes variantes d'histones et de modifications chimiques de l'ADN et des histones (**Figure 1**). La diversité des combinaisons possibles génère des différences structurales et fonctionnelles importantes au sein de la chromatine, qui permet à cette structure d'être le support d'une information essentielle à l'identité cellulaire, l'information épigénétique. De plus, ces combinaisons étant facilement modifiables, la chromatine est une architecture extrêmement dynamique, permettant aux cellules de répondre rapidement à des changements d'environnement, comme en réponse à un stress génotoxique.

3. Dynamique de la chromatine en réponse aux dommages induits par les UVC

Différentes activités métaboliques, comme la réplication et la réparation de l'ADN sont critiques pour préserver l'intégrité structurale et fonctionnelle de la chromatine. Les lésions de l'ADN induites par stress génotoxique sont particulièrement dangereuses car elles ne sont pas programmées, et sont donc susceptibles d'avoir lieu n'importe où, n'importe quand dans le noyau cellulaire. Comprendre comment l'organisation bien définie de la chromatine, porteuse à la fois de l'information génétique et épigénétique, est préservée ou altérée après dommages de l'ADN est donc une question de première importance. Dans cette partie, je vous présenterai nos connaissances actuelles de la plasticité de la chromatine induite par les lésions de l'ADN, en m'intéressant essentiellement à la dynamique des nucléosomes en réponse à une irradiation aux UVC dans les cellules de mammifères. Des études poussées de cette dynamique dans d'autres organismes eucaryotes ainsi qu'en réponse à d'autres types de dommages, comme les cassures double brin de l'ADN, ont également été réalisées. Pour plus de détails, je vous renvoie aux revues suivantes (Papamichos-Chronakis and Peterson, 2013; Peterson and Almouzni, 2013; Polo, 2015; Price and D'Andrea, 2013; Smeenk and van Attikum, 2013) et à celles que j'ai eu l'opportunité d'écrire (**Annexes 1-4**).

3.1. Réarrangements de la chromatine en réponse aux UVC : modèle « Accessibilité-Réparation-Restitution »

Le modèle qui prévaut actuellement pour décrire la manière dont s'exerce la réparation des dommages de l'ADN, provoqués par les UVC ou par tout autre agent génotoxique, dans le contexte de la chromatine, est le modèle « Accessibilité-Réparation-Restitution » (Green and Almouzni, 2002; Groth et al., 2007b, Moggs and Almouzni, 1999; Smerdon, 1991; Soria et al., 2012) (**Figure 17**). Dans ce modèle, la chromatine endommagée est déstabilisée localement, facilitant ainsi la détection des lésions de l'ADN. Après réparation des lésions, l'organisation initiale de chromatine est restituée, avec notamment incorporation de nouvelles histones (discutée dans la partie 3.3.3).

Ce modèle s'appuie sur des observations initialement obtenues *in vitro* et sur des cellules humaines en culture exposées aux UVC. En dépit de la courte taille du fragment d'ADN produit lors de la synthèse réparatrice (environ 30 nucléotides) (Edenberg and Hanawalt, 1972), un minimum de 100 nucléotides autour de la lésion est nécessaire pour une excision efficace *in vitro* (Huang and Sancar, 1994). Ces données suggèrent qu'un nucléosome au moins doit être désorganisé et/ou déplacé pour permettre la réparation de l'ADN *in vivo*. L'étude de l'accessibilité de la chromatine aux nucléases, qui coupent

préférentiellement l'ADN entre les particules nucléosomales apporta la preuve formelle de ces altérations. En effet, des expériences de digestion partielle à la MNase sur de la chromatine purifiée à partir de fibroblastes irradiés aux UVC ont démontré que les régions de chromatine en cours de réparation présentent une augmentation transitoire de sensibilité (Smerdon and Lieberman, 1978). Ces résultats furent ensuite confirmés par utilisation d'autres nucléases, comme la DNase I (DNA Nuclease I) (Smerdon and Lieberman, 1980) ou des enzymes de restriction chez la levure (Gong et al., 2006). Plus récemment, des analyses de FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) sur des nucléosomes reconstitués *in vitro* ont mis en évidence que les nucléosomes endommagés aux UVC restent dans un état partiellement déroulé pendant un temps plus long que les nucléosomes non irradiés (Duan and Smerdon, 2010). Ainsi, les lésions de l'ADN générées par les UVC modifient *in vitro* l'enroulement de l'ADN autour des histones rien que par leur présence, ce qui pourrait faciliter la détection des dommages par les machineries de réparation *in vivo*. Cependant, il ne s'agit sûrement pas du seul mécanisme de désorganisation de la chromatine, puisque des réarrangements de plus grande ampleur ont été mis en évidence *in vivo*, s'étendant sur une région d'environ 2 kb au-delà du site de dommage (Mathis and Althaus, 1990). Une expérience basée sur l'analyse de la sensibilité de la chromatine à la dénaturation par l'acide chlorhydrique fait même état d'une déstabilisation globale de la chromatine après irradiation locale aux UVC (Rubbi and Milner, 2003). L'étendue des altérations de la structure de la chromatine après dommages induits par les UVC doit néanmoins faire l'objet d'études complémentaires.

Quant à la restitution de l'architecture de la chromatine couplée à la réparation NER, elle fut initialement observée grâce aux analyses, précédemment mentionnées, de sensibilité aux nucléases de la chromatine endommagée (Smerdon and Lieberman, 1978; 1980). Les régions de chromatine en cours de réparation redeviennent progressivement résistantes pour finalement présenter le même profil de digestion que la chromatine non endommagée. Ces données ont conduit à la proposition d'un modèle de réorganisation de la chromatine en deux étapes. Tout d'abord, l'ADN réparé est de nouveau entouré autour de nucléosomes, puis ces nucléosomes sont repositionnés afin de restituer la configuration initiale de la chromatine. Ces résultats furent ensuite consolidés *in vitro* par la mise en évidence d'un assemblage des nucléosomes couplé à la réparation de l'ADN (Gaillard et al., 1996). Cet assemblage en système acellulaire peut même se propager sur plusieurs centaines de bases au-delà du court fragment d'ADN néo-synthétisé (Gaillard et al., 1997). En outre, des histones néo-synthétisées sont mises en place dans la chromatine réparée *in vivo* (présenté en **Figure 17** et détaillé en partie 3.3.3)

L'ensemble de ces données sur la dynamique de la chromatine associée à la réparation NER a permis de révéler que la structure de la chromatine est considérablement altérée, au moins transitoirement, en réponse aux dommages de l'ADN (**Figure 17**). Des études plus

récentes se sont intéressées à identifier les acteurs moléculaires impliqués dans ces réarrangements (facteurs de réparation et/ou de dynamique de la chromatine), ces études ayant apporté un éclairage nouveau sur la plasticité de la chromatine après stress génotoxique.

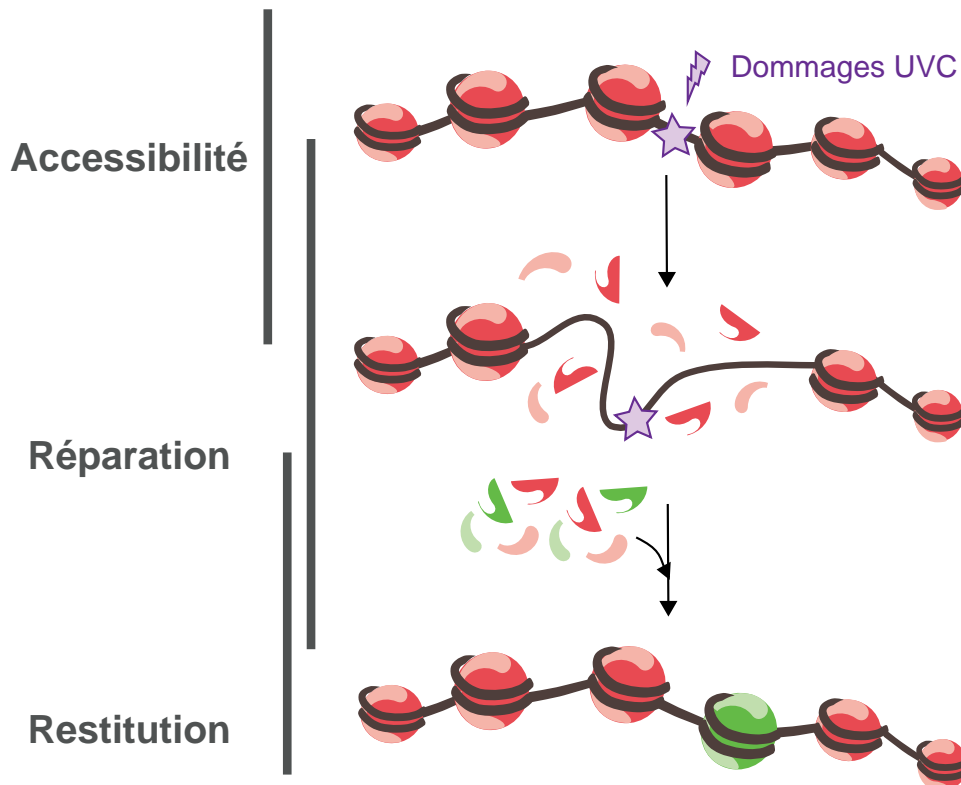


Figure 17 : Modèle « Accessibilité-Réparation-Restitution ». Ce modèle illustre la dynamique des histones (en rouge) en réponse aux dommages de l'ADN dans les cellules humaines. Après réparation des lésions, l'organisation de la chromatine serait restituée de manière plus ou moins fidèle, avec incorporation de nouvelles histones (en vert). Modèle inspiré de (Groth et al., 2007b).

3.2. Modifications post-traductionnelles des histones induites par les UVC

Les modifications des histones font partie des facteurs clés de la dynamique de la chromatine post irradiation aux UVC, intervenant dans la régulation des diverses réponses cellulaires induites par les lésions (cf. **Tableau 6**, **Figures 18 - 19**, et revue (Li, 2012)).

3.2.1. Acétylation des histones

Historiquement, l'acétylation fut la première marque post-traductionnelle d'histones étudiée (**Tableau 6**). Dans les fibroblastes humains irradiés aux UVC, une vague précoce et rapide d'hyper-acétylation des histones cœurs (Ramanathan and Smerdon, 1986) faciliterait la réparation des dommages par NER (Ramanathan and Smerdon, 1989). Chez la levure, après irradiation aux UVC, Gcn5 (General control non-derepressible 5) acétyle l'histone H3 sur les

résidus lysine 9 et 14, permettant ainsi l'ouverture de la chromatine nécessaire pour la détection des dommages (cf. revues (Reed, 2011; Waters et al., 2012)). GCN5 contrôlerait la réparation par NER via un mécanisme similaire dans les cellules humaines. En effet, GCN5, recruté aux sites de dommages par E2F1 (Guo et al., 2011) et potentiellement par le complexe UV-DDB (Martinez et al., 2001), est requis pour l'acétylation de H3K9 et l'accumulation aux sites de dommages des facteurs précoces du NER dans les minutes qui suivent l'irradiation (Guo et al., 2011; 2010). Mais l'impact de GCN5 sur la désorganisation de la chromatine et l'induction de l'acétylation de H3K14 provoqué par les UVC (Allison and Milner, 2003) n'a pas encore été analysé dans les cellules humaines. Les histone acétyl-transférases p300 et son homologue CBP (CREB binding protein), qui s'associent aux facteurs de réparation DDB2 et CSB (Datta et al., 2001; Fousteri et al., 2006), sont aussi impliquées dans les réponses cellulaires induites par les UVC. p300, qui s'accumule aux sites de dommages de manière p53 dépendante, facilite la réparation NER (Rubbi and Milner, 2003). Le fait que p53 contrôle à la fois la relaxation de la chromatine et l'augmentation du niveau d'acétylation de H3K9 après irradiation aux UVC, en plus du recrutement de p300 (Rubbi and Milner, 2003) suggère que p300, via son activité histone acétyl-transférase, faciliterait la détection des dommages générés par les UVC. L'histone H4, et notamment sa lysine 16, a aussi été rapportée comme étant rapidement acétylée après irradiation aux UVC dans les cellules humaines et/ou murines (Guo et al., 2011; Kuo et al., 2007; Lange et al., 2008; Wang et al., 2006b). Mais de futures recherches devront déterminer si cette acétylation favorise la reconnaissance des lésions de l'ADN.

De plus, l'acétylation des histones pourraient jouer un rôle dans les étapes finales de la réparation. Par exemple, PCNA, facteur tardif du NER, interagit avec p300 (Hasan et al., 2001) et cette interaction, qui est inhibée par p21, bloque l'activité acétyl-transférase de p300 *in vitro* (Cazzalini et al., 2008). Ces données permettent de supposer que p300 acétylerait les histones au cours des étapes tardives du NER, sous le contrôle de PCNA et p21, facilitant ainsi la finalisation de la réparation. Cependant, en l'état actuel des données, il est impossible de savoir si ce rôle potentiel de p300 est strictement lié à sa capacité d'acétyler les histones car il a été récemment démontré que p300/CBP acétylent aussi des facteurs NER, tels PCNA et XPG (Cazzalini et al., 2014; Tillhon et al., 2012). Enfin, l'acétylation des histones est susceptible de réguler d'autres aspects de la réponse aux dommages générés par les UVC. TIP60 (Tat-Interacting Protein 60), impliqué dans l'acétylation UVC-induite de H2A et éventuellement d'autres histones, est requis pour l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire après irradiation aux UVC (Cheng et al., 2008). Par contre, l'accumulation dans la chromatine réparée d'histones porteuses de la marque H3K56ac, sous le contrôle du chaperon d'histone ASF1 et des histone acétyl-transférases p300/CBP (Battu et al., 2011; Das et al., 2009), permet d'éteindre les points de contrôle du cycle, ceci ayant été démontré dans des cellules humaines exprimant une forme non-acétylable de H3K56 (Battu et al., 2011).

Les histones ne sont pas qu'acétylées en réponse aux dommages provoqués par les UVC, mais aussi potentiellement dé-acétylées. En effet, la phase précoce d'hyper-acétylation des histones cœurs observée dans les fibroblastes humains irradiés aux UVC, précède une vague d'hypo-acétylation avant un retour à la normale (Ramanathan and Smerdon, 1986). Des études plus récentes de cinétiques d'acétylation des histones par western-blot sur des extraits totaux de cellules humaines et/ou murines irradiées aux UVC a révélé une perte, sûrement transitoire, de H3K9ac et H3K56ac dans les heures qui suivent l'irradiation (Battu et al., 2011; Shimada et al., 2008; Tjeertes et al., 2009). Or, on ne connaît toujours pas actuellement ni la fonction de cette perte d'acétylation dans le NER ni si celle-ci correspond effectivement à une dé-acétylation active des histones et/ou à une dégradation spécifique des histones porteuses de ces marques (Qian et al., 2013). L'analyse future de ces questions devrait permettre de mieux comprendre la dynamique de l'acétylation des histones induite par les UVC.

3.2.2. Ubiquitylation des histones

L'ubiquitylation des histones après irradiation aux UVC (**Tableau 6**) est le fruit de l'activité de plusieurs E3 ubiquitine ligases agissant à différentes étapes de la voie NER. L'utilisation de cellules de patients mutés pour la protéine DDB2 a d'abord permis de démontrer que le complexe UV-DDB est requis pour ubiquityler l'histone H2A *in vitro* et *in vivo* (Guerrero-Santoro et al., 2008; Kapetanaki et al., 2006) sur les lysines 119 et 120 (Lan et al., 2012). Ce complexe est aussi impliqué dans l'ubiquitylation UVC-induite de H2B, H3 et H4 (Takedachi et al., 2010; Wang et al., 2006a) mais les sites ubiquitylés n'ont pas encore été identifiés. Afin de comprendre l'importance fonctionnelle de ces marques, des analyses *in vitro* du devenir des histones ubiquitylées ont été réalisées. Malheureusement, celles-ci donnent des résultats contradictoires, l'ubiquitylation *in vitro* de H3 par le complexe UV-DDB étant suffisante ou non pour évincer cette histone de la chromatine (Takedachi et al., 2010; Wang et al., 2006a). Par contre, l'ubiquitylation de H2A *in vitro* par UV-DDB déstabilise l'organisation nucléosomale, les histones H2A et H3 étant extraites de la chromatine à des concentrations plus faibles en sel (Lan et al., 2012). De plus, des analyses de fractionnement biochimique de cellules humaines soumises à une irradiation UVC suggèrent que H3 ubiquitylée se solubilise en partie en réponse aux UVC *in vivo* (Wang et al., 2006a). L'ensemble de ces données laisse présager que l'ubiquitylation des histones UVC-dépendante rendrait moins stable la structure de la chromatine endommagée, ce qui pourrait servir de signal facilitant le recrutement de facteurs impliqués dans la détection des lésions. Des recherches complémentaires devraient conforter ou infirmer cette hypothèse.

Marques	Enzymes	Facteurs impliqués	Importance fonctionnelle	Références
Acétylation (ac) / Dé-acétylation				
H2A (+ autres?)	TIP60	SUMO	TIP60 contrôle l'activation du point de contrôle cellulaire	(Cheng et al., 2008)
H3K9/K56	GCN5	E2F1, UV-DDB?	GCN5 et E2F1 stimulent le recrutement de XPA et XPC aux sites de dommages	(Brand et al., 2001; Guo et al., 2010; 2011; Martinez et al., 2001)
		p53, DDB2?	p53 favorise la déstabilisation de la chromatine	(Datta et al., 2001; Rubbi and Milner, 2003)
	p300/CBP	p21, PCNA	PCNA et p21 contrôlent l'activité de p300 <i>in vitro</i> = rôle dans le remodelage tardif de la chromatine?	(Cazzalini et al., 2008; Hasan et al., 2001)
		CSB	Rôle dans le TC-NER?	(Fousteri et al., 2006)
		Chaperon ASF1, ATM	ASF et H3K56ac contrôlent l'arrêt du point de contrôle du cycle cellulaire mais pas la réparation NER = rôle dans la restitution de l'organisation de la chromatine?	(Battu et al., 2011; Das et al., 2009)
	?		Perte de H3K9ac	(Tjeertes et al., 2009)
?		Perte transitoire de H3K56ac	(Battu et al., 2011; Tjeertes et al., 2009)	
H3K14	?	p53	Acétylation de H3K14 (données contradictoires)	(Allison and Milner, 2003; Shimada et al., 2008)
H4 (H4K16?)	?	HMGB1, ING1b, ING2	HMGB1 (<i>cellules murines</i>), ING1b et ING2 sont requis pour une réparation efficace des lésions, pour la désorganisation de la chromatine et l'élévation du niveau de H4ac	(Guo et al., 2011; Kuo et al., 2007; Lange et al., 2008; Wang et al., 2006b)
Ubiquitylation (ub)				
H2A	UV-DDB (K119/120)		H2Aub déstabilise les nucléosomes	(Guerrero-Santoro et al., 2008; Kapetanaki et al., 2006; Lan et al., 2012)
	RNF2 (K119)	XPC, XPG?	Rôle associé aux étapes finales du NER?	(Bergink et al., 2006)
	Ubc13/RNF8?	ADN simple brin, ATR, MDC1	Une baisse d'expression d'Ubc13 ou de RNF8 sensibilise les cellules aux UVC sans altérer la synthèse réparatrice	(Marteijn et al., 2009)
	?	Chaperon CAF-1	Rôle dans la restitution de l'organisation de la chromatine?	(Zhu et al., 2009)
H2B, H3, H4	UV-DDB		L'ubiquitylation augmenterait l'extraction des histones de la chromatine endommagée	(Takedachi et al., 2010; Wang et al., 2006a)
Phosphorylation (ph)				
H2A.XS139	ATR	XPA, XPC, XPG, ADN simple brin	H2A.XS139ph n'est pas requise pour la survie cellulaire post irradiation UVC (<i>cellules murines</i>)	(Hanasoge and Ljungman, 2007; Marti et al., 2006; Matsumoto et al., 2007; Revet et al., 2011; Stiff et al., 2006)
		TopBP1, cassures?	L'induction tardive de H2AXS139ph est associée à un défaut de réparation NER	(Oh et al., 2011a; Vrouwe et al., 2011)
H3S10	TLK1B?		Baisse transitoire du niveau de H3S10ph?	(Sen and De Benedetti, 2006)
H3T11	Chk1/PP1γ	ATR, CDK	La baisse transitoire du niveau de H3T11ph est corrélée à un décrochage de Chk1 de la chromatine, à une activation de PP1 γ , et à l'inhibition de la transcription (<i>cellules humaines et murines</i>)	(Shimada et al., 2008; 2010)
Méthylation (me)				
H3K79	DOT1L		DOT1L facilite la reprise de la transcription post irradiation (<i>cellules murines</i>)	(Oksenysh et al., 2013)
H4K20	Suv4-20h		Les cellules déficientes Suv4-20h sont hypersensibles aux UVC (<i>cellules murines</i>)	(Schotta et al., 2008)

Tableau 6 : Principales marques post-traductionnelles des histones induites par les UVC. Données sur des cellules humaines, sauf mention spéciale. Aucune modification de l'histone H1 n'a été rapportée en réponse à une irradiation aux UVC à ce jour. ATM: Ataxia telangiectasia mutated, CDK: Cyclin-Dependent Kinase, E2F1: E2F Transcription Factor 1, HMGB1: High Mobility Group Box 1, ING: Inhibitor of Growth family, MDC1: Mediator of DNA Damage Checkpoint 1, SUMO: Small Ubiquitin-related Modifier, Suv4-20h: Suppressor of variegation 4-20 homolog, TopBP1: Topoisomerase II Binding Protein 1.

L'histone H2A ubiquitylée sur la lysine 119 par l'enzyme RNF2 (Ring Finger Protein 2) s'accumule aussi au sein de la chromatine lésée aux UVC, cette accumulation nécessitant une voie de réparation GG-NER fonctionnelle (Bergink et al., 2006). En outre, l'E2 conjuguase Ubc13 et l'E3 ligase RNF8 sont recrutées aux sites de dommages UVC et y facilitent l'ubiquitylation de H2A, couplée à la formation d'ADN simple brin pendant l'incision du brin porteur de la lésion (Marteijn et al., 2009). Une baisse d'expression d'Ubc13 ou de RNF8 sensibilise les cellules aux UVC sans affecter le niveau de synthèse réparatrice. L'ubiquitylation de H2A est donc susceptible de jouer un rôle dans la reconfiguration de la structure de la chromatine après réparation des lésions. Conformément à cette hypothèse, il a été récemment révélé que le chaperon d'histones CAF-1, impliqué dans la réorganisation de la chromatine après réparation des dommages (cf. partie 3.3.3) favorise l'accumulation de H2A ubiquitylée dans la chromatine (Zhu et al., 2009). Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier si l'ubiquitylation, en complément de l'acétylation des histones, marques connues pour déstabiliser la structure nucléosomale, pourraient aider au repositionnement des nucléosomes néoformés, restituant ainsi l'architecture originale de la chromatine.

3.2.3. Autres modifications des histones

Comme en réponse aux cassures double brin de l'ADN, le variant d'histone H2A.X est phosphorylé localement sur sa sérine 139 dans l'heure qui suit l'irradiation aux UVC (Marti et al., 2006; Stiff et al., 2006) (**Tableau 6**). Cette phosphorylation, ayant lieu dans toutes les phases du cycle cellulaire, est principalement assurée par la kinase ATR (Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3-related) sous le contrôle des facteurs de réparation XPC, XPA et XPG (Hanasoge and Ljungman, 2007; Marti et al., 2006; Matsumoto et al., 2007; Stiff et al., 2006). De même que pour l'ubiquitylation de H2A, perturber la synthèse réparatrice par utilisation d'inhibiteurs d'ADN polymérases augmente considérablement le niveau de phosphorylation de H2A.X (Hanasoge and Ljungman, 2007; Matsumoto et al., 2007). Ces résultats suggèrent que la formation d'ADN simple brin au cours de la réparation NER servirait de signal de modification de H2A.X après irradiation aux UVC. Les cellules murines exprimant une forme non-phosphorylable de H2A.X.S139, bien qu'hypersensibles à une irradiation aux rayons X, ne présentent aucune sensibilité aux UVC (Revet et al., 2011). H2A.X.S139ph ne semble donc pas contrôler la réparation des lésions générées par les UVC. D'autre part, les cellules humaines déficientes dans la voie NER présentent une induction

tardive et/ou persistante de la phosphorylation de H2AX par ATR en réponse à une irradiation aux UVC (Oh et al., 2011a; Vrouwe et al., 2011). Cette modification signalerait alors la non-élimination des dommages induits par les UVC et permettrait l'activation d'autres voies de réparation, hypothèse qui reste à démontrer.

Dans les cellules de mammifères, le niveau de phosphorylation de la sérine 10 et la thréonine 11 de l'histone H3, sous le contrôle respectif de TLK1B (Tousled Like Kinase 1B, à démontrer formellement) et Chk1/PP1 γ (Checkpoint Kinase 1/ Protein Phosphatase 1 γ) diminue puis augmente après réparation des dommages (Sen and De Benedetti, 2006; Shimada et al., 2008; 2010) (**Tableau 6**). Cependant, des recherches additionnelles sont nécessaires afin de préciser la dynamique de ces phosphorylations, les changements observés pouvant en effet être le reflet des altérations du cycle cellulaire provoquées par les UVC, de façon similaire à ce qui a été démontré après traitement de cellules humaines avec un agent radiomimétique (Tjeertes et al., 2009).

Enfin, la méthylation des histones H3 et H4 a été récemment impliquée dans la réponse aux dommages générés par les UVC (**Tableau 6**), principalement chez la levure, la drosophile et la souris (cf. revue (Li, 2012)). Mais sa dynamique dans les cellules humaines ainsi que son importance fonctionnelle doivent faire l'objet d'études complémentaires.

Dans cette partie, je vous ai donc démontré qu'en réponse aux lésions induites par les UVC, les histones sont sujettes à de profonds changements de leur profil de modifications post-traductionnelles, même si comment la mise en place de marques différentes est coordonnée dans le temps et l'espace n'est pas connu actuellement. Alors que la plupart des études dans le domaine recherchent les mécanismes sous-jacents, peu d'entre elles s'intéressent au devenir des marques néo-déposées. Or, c'est une question de première importance, car si ces informations sont conservées dans la chromatine réparée, elles sont susceptibles de modifier l'information portée initialement par la chromatine. De plus, il ne s'agit pas du seul processus UVC-dépendent qui menace l'intégrité de l'information épigénétique, car les histones sont également mobilisées après dommages.

3.3. Mobilisation d'histones au sein de la chromatine endommagée par les UVC

Conformément au modèle « Accessibilité-Réparation-Restitution » (**Figure 17**), les histones ont une mobilité accrue en réponse aux dommages induits par les UVC. En effet, les étapes précoces de la réparation NER sont marquées par une perte de densité d'histones dans les régions de chromatine endommagées (**Figure 18**) tandis que les étapes tardives sont associées à de l'incorporation d'histones (**Figure 19**). Les chaperons d'histones et les facteurs de remodelage de la chromatine sont des protéines clés de cette dynamique (Dinant et al.,

2012; House et al., 2014), et leur rôle dans la réponse aux dommages aux UVC dans les cellules de mammifères va maintenant vous être exposé (tout ce qui a trait au TC-NER et/ou au contrôle de l'activité transcriptionnelle après irradiation aux UVC sera décrit en partie 3.4).

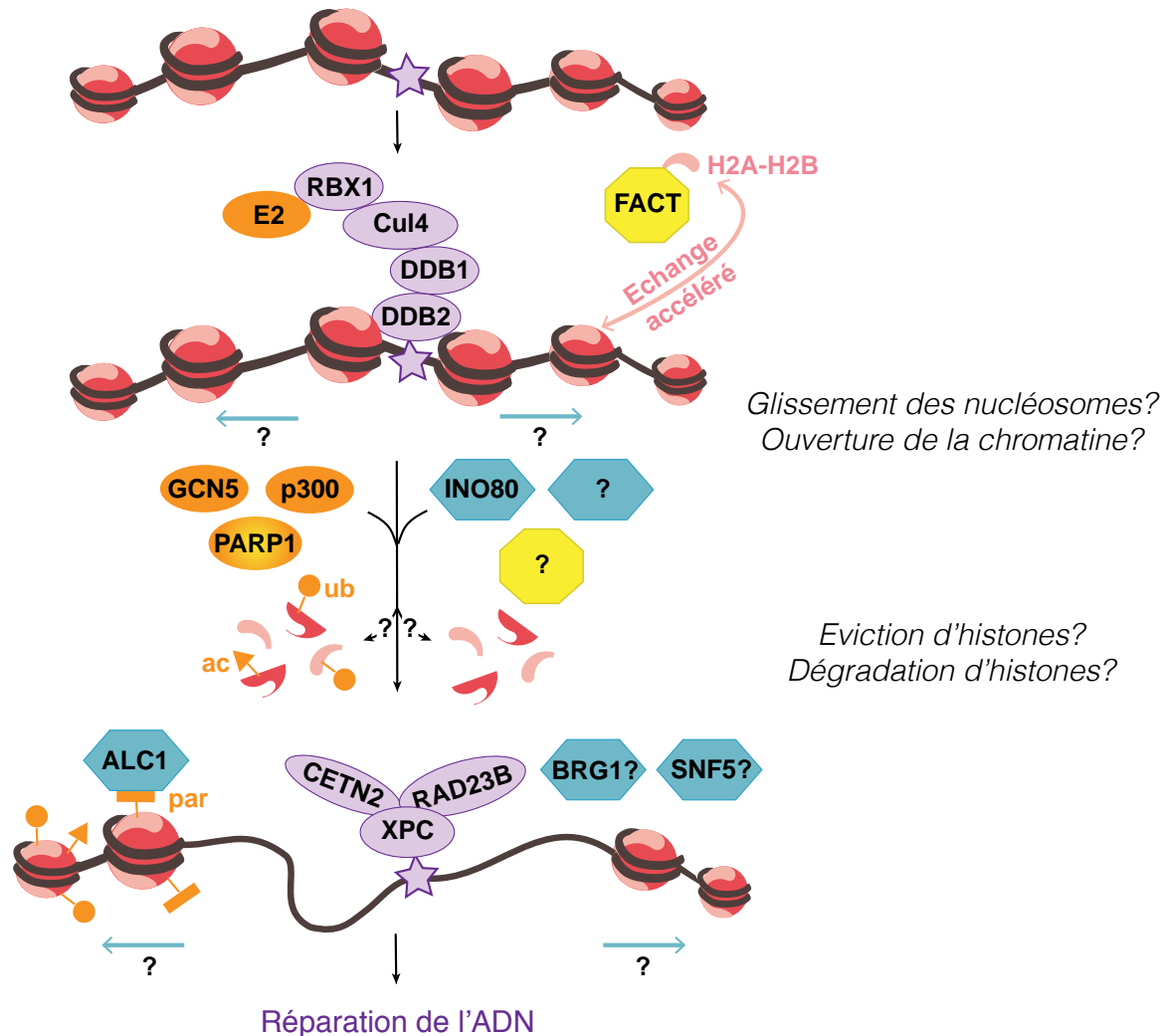


Figure 18 : Modèle illustrant la dynamique des histones couplée aux étapes précoces de la réparation NER. Au site de dommages de l'ADN (étoile violette), la chromatine est rendue accessible aux facteurs NER par l'action concertée d'enzymes de modification de la chromatine (orange), de facteurs de remodelage de la chromatine (bleu) et probablement de chaperons d'histones (jaune). Le complexe UV-DDB (DDB2 et protéines associées) est un facteur de réparation clé, car il ubiquitine les histones cœurs (ub), favoriserait l'accumulation de INO80 aux sites de lésions, et facilite la poly-ADP ribosylation (par) de la chromatine endommagée, assurant ainsi le recrutement d'ALC1. De plus, il est probable qu'UV-DDB soit impliqué dans l'acétylation (ac) des histones H3 réalisée par GCN5 et p300. Quant au complexe XPC, il permet le recrutement de BRG1 et de SNF5 aux dommages. FACT, indépendamment du NER, est responsable de l'échange accéléré de H2A-H2B aux sites UVC. Néanmoins, même si les facteurs sont maintenant identifiés, il reste à éclaircir les mécanismes rendant accessible la chromatine endommagée : décondensation de la chromatine ? glissement des nucléosomes ? éviction et/ou dégradation des histones ? Les modifications post-traductionnelles des facteurs GG-NER n'ont pas été indiquées par souci de clarté. Données tirées de la revue (Marteijn et al., 2014).

3.3.1. Perte de densité d'histones incorporées & remodelage précoce de la chromatine

Irradier aux UVC des cellules humaines provoque une perte de densité des histones H2A et H4 limitée aux régions de chromatine endommagées (Luijsterburg et al., 2012). Cette désorganisation de la chromatine ATP- (Adénosine TriPhosphate) dépendante n'est pas spécifique des histones cœurs du nucléosome, car l'histone lien H1 présente la même dynamique. Elle nécessite de plus la présence du facteur de réparation DDB2 et l'activité de PARP1 (Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1), et corrèle avec une détection efficace des lésions par XPC. Néanmoins, les mécanismes contrôlant cette perte locale d'histones restent à déterminer (**Figure 18**). Une baisse de la densité d'ADN étant aussi observée aux sites de dommages (Luijsterburg et al., 2012), des mécanismes induisant une décondensation de la chromatine semblent donc à l'œuvre. La dépendance vis à vis de l'ATP et de la poly-ADP-ribosylation suggère que des facteurs de remodelage de la chromatine sont impliqués (**Figure 11**). Parmi eux, ALC1 (Amplified in Live Cancer 1) représente un candidat intéressant puisque son recrutement dans les minutes qui suivent une irradiation locale aux UVC est facilité par DDB2 et PARP1, et sa diminution d'expression par shARN conduit à un défaut de réparation des dommages CPD (Pines et al., 2012). Mais son rôle dans le remodelage de la chromatine irradiée aux UVC reste à étudier. Un autre facteur de remodelage à chromo-domaine, CHD2, pourrait également aider à désorganiser l'architecture de la chromatine en réponse aux lésions induites par les UVC, les cellules murines mutantes pour *Chd2* présentant une hyper-sensibilité aux UVC (Rajagopalan et al., 2012).

D'autres familles de facteurs de remodelage de la chromatine, telles que SWI/SNF, INO80 et ISWI, participent aux réponses cellulaires induites par les UVC. Comme ce qui est observé chez la levure (Gong et al., 2006), plusieurs facteurs SWI/SNF, notamment BRG1 (Brahma-Related Gene 1) et SNF5 (Sucrose Non Fermentable 5), favorisent la survie et/ou la réparation des dommages CPD après irradiation aux UVC chez les mammifères (Gong et al., 2008; Klochendler-Yeivin et al., 2006; Zhang et al., 2009; Zhao et al., 2009). Cependant, ni le mode de recrutement aux dommages, ni le rôle joué par ces facteurs dans la réponse aux UVC n'a encore été complètement élucidé, des données contradictoires existant dans la littérature. En effet, une première étude démontre que BRG1 s'associe rapidement aux dommages de l'ADN de manière XPC-dépendante, et y facilite l'accumulation des facteurs tardifs du NER (XPG et PCNA) sans affecter celui des facteurs précoces (DDB2, XPC, XPB) (Zhao et al., 2009). Par contre, une autre étude fait état d'un enrichissement tardif de BRG1 aux sites de lésions CPD (8 h après irradiation UVC) mais BRG1 est quand même requis pour le recrutement de XPC 30 min post UVC (Zhang et al., 2009). Cette action précoce de BRG1 serait alors indépendante de sa capacité à s'associer aux dommages. Alors que des analyses comparées de sensibilité à la MNase de chromatine endommagée aux UVC provenant de cellules déficientes ou non en BRG1 montrent que ce facteur de remodelage stimule la

désorganisation de la chromatine induite par les UVC (Zhao et al., 2009), l'absence de BRG1 et BRM (Brahma) n'affecte pas la perte de densité des histones H4 aux sites de dommages (Luijsterburg et al., 2012). De futures recherches devront donc résoudre ces contradictions, différentes méthodes et lignées cellulaires ayant été utilisées. De même, le rôle de SNF5 a été longtemps contesté (Klochender-Yeivin et al., 2006; McKenna et al., 2008), mais une analyse plus récente sur cellules humaines établit que SNF5, recruté aux sites de lésions de l'ADN induites par les UVC par XPC, y stimule la phosphorylation de H2A.X (Ray et al., 2009).

Contrairement à SWI/SNF, deux fonctions totalement distinctes ont été découvertes pour INO80 chez la levure et l'homme en réponse à une irradiation aux UVC. Tandis que chez la levure, INO80 est requis pour reconstituer l'architecture nucléosomale après réparation des dommages (Sarkar et al., 2010), dans les cellules humaines, ce complexe protéique est nécessaire pour la déstabilisation de la chromatine induite par les UVC (Jiang et al., 2010). INO80 humain s'associe tôt aux dommages, sûrement grâce à son interaction avec le complexe de détection des lésions UV-DDB, et y favorise l'enrichissement des protéines précoces/intermédiaires du NER (XPC et XPA). Enfin peu d'éléments supporte actuellement un rôle dans le NER du complexe de remodelage de la chromatine ACF (ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor), membre de la famille ISWI (sauf dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle par les UVC présenté en partie 3.4.2). Bien que le complexe ACF facilite la réparation des dommages 6-4PP dans l'ADN lien *in vitro* (Ura et al., 2001), son impact *in vivo* est contesté, différentes études faisant état ou non d'un recrutement d'ACF aux sites de lésions générées par les UVC et d'une très faible hypersensibilité aux UVC des cellules humaines traitées avec un siACF1 (Lan et al., 2010; Luijsterburg et al., 2009). ACF, serait en fait également impliqué dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire post irradiation aux UVC (Sánchez-Molina et al., 2011). L'ensemble des données présentées ici apporte donc la preuve que les facteurs de remodelage de la chromatine jouent un rôle clé dans les étapes précoces de la voie NER. Cependant leurs modalités d'action sont encore loin d'être comprises, puisque ces facteurs peuvent faciliter la déstabilisation de l'architecture de la chromatine par différents moyens interdépendants: ouverture de la chromatine, échange d'histones, glissement des nucléosomes de manière à les éloigner des lésions (**Figure 18**)...

La désorganisation de la chromatine ferait aussi appel à des mécanismes d'éviction d'histones, car une solubilisation des histones en réponse à une irradiation aux UVC a été révélée (Wang et al., 2006a). Ces mécanismes pourraient faire intervenir des chaperons d'histones (**Tableau 4**) même si actuellement aucun d'entre eux a été formellement identifié comme facilitant la détection des dommages induits par les UVC. Néanmoins, l'étude d'autres dommages de l'ADN a permis de démontrer que les chaperons ASF1 et Nucléoline

assuraient le déplacement respectif des histones H3-H4 et H2A-H2B aux sites de cassures double brin de l'ADN (Goldstein et al., 2013), et ces derniers pourraient avoir une fonction équivalente aux sites de lésions induites par les UVC. Le chaperon Nucléophosmine (NPM1), impliqué *in vitro* dans la dynamique des histones couplée à la transcription (cf. revue (Gurard-Levin et al., 2014)) est un autre candidat intéressant, car la surexpression de NPM1 rend les cellules murines résistantes à une irradiation aux UVC (Wu et al., 2002). Mais, NPM1 pourrait avoir un tout autre rôle que celui de promouvoir la réparation NER car il a été récemment démontré que NPM1 protège la polymérase translésionnelle η de la dégradation après irradiation aux UVC, facilitant ainsi la synthèse translésionnelle des dommages induits par les UVC (Ziv et al., 2014). Enfin, il serait judicieux d'analyser de plus près la fonction de PARP1 dans la détection des lésions générées par les UVC (Luijsterburg et al., 2012; Pines et al., 2012), PARP1 poly-ADP ribosylé présentant une activité de chaperon d'histones *in vitro* (Muthurajan et al., 2014).

En plus de rendre accessible la chromatine à la machinerie de réparation, l'éviction d'histones pourrait représenter un moyen d'éliminer des histones endommagées par les UVC (**Figure 18**). En effet, une irradiation aux UVC peut provoquer la formation d'espèces réactives de l'oxygène via des mécanismes de photosensibilisation (Pattison and Davies, 2006), les histones oxydées par ces molécules seraient ensuite dégradées (Bader and Grune, 2006). Néanmoins, aucune dégradation d'histones en réponse aux UVC n'a été mentionnée dans la littérature à ce jour, contrairement à ce qui a été observé après irradiation ionisante dans des cellules murines (dégradation acétylation-dépendante des histones, (Qian et al., 2013)). Le recyclage des histones « déplacées » par les mêmes chaperons qui les auraient mobilisés (**Figure 19**) est une autre alternative envisageable qui contribuerait à réorganiser la chromatine après réparation des lésions. De futures recherches s'attellant à étudier le devenir des anciennes histones « déplacées » sont donc nécessaires pour comprendre comment l'information originale portée par la chromatine avant stress génotoxique peut être préservée.

3.3.2. *Echange accéléré d'histones*

En complément de la perte de densité, un échange accéléré d'histones dans les régions de chromatine endommagées a été mis en lumière par des expériences de FRAP combinées à des irradiations localisées aux UVC dans les cellules humaines. Ainsi, les histones H2A-H2B porteuses de l'étiquette GFP (Green Fluorescent Protein) présentent une mobilité accrue aux sites de lésions, cette mobilité étant sous le contrôle du chaperon FACT (Dinant et al., 2013) (**Figure 18**). Par contre, cet échange rapide n'est pas observé pour les histones H3.1 et H4. Le fait que la dynamique accrue de H2A-H2B ait lieu dans les minutes qui suivent l'irradiation aux UVC et de manière indépendante des facteurs NER suggère que cette dynamique faciliterait les étapes précoces de la réparation. Néanmoins cette hypothèse n'est pas encore

formellement démontrée, un rôle plutôt dans la reprise de la transcription ayant été avancé (Dinant et al., 2013) (cf. partie 3.4.2). Enfin, les variants d'histones H2A.X et H2A.Z sont plus mobiles aux sites de micro-irradiation laser 405 nm (Ikura et al., 2007; Nishibuchi et al., 2014), mais si c'est le cas aussi après dommages aux UVC reste à déterminer.

3.3.3. Incorporation d'histones

Après réparation des dommages, la chromatine est réorganisée grâce notamment à l'incorporation d'histones néo-synthétisées (**Figure 19**).

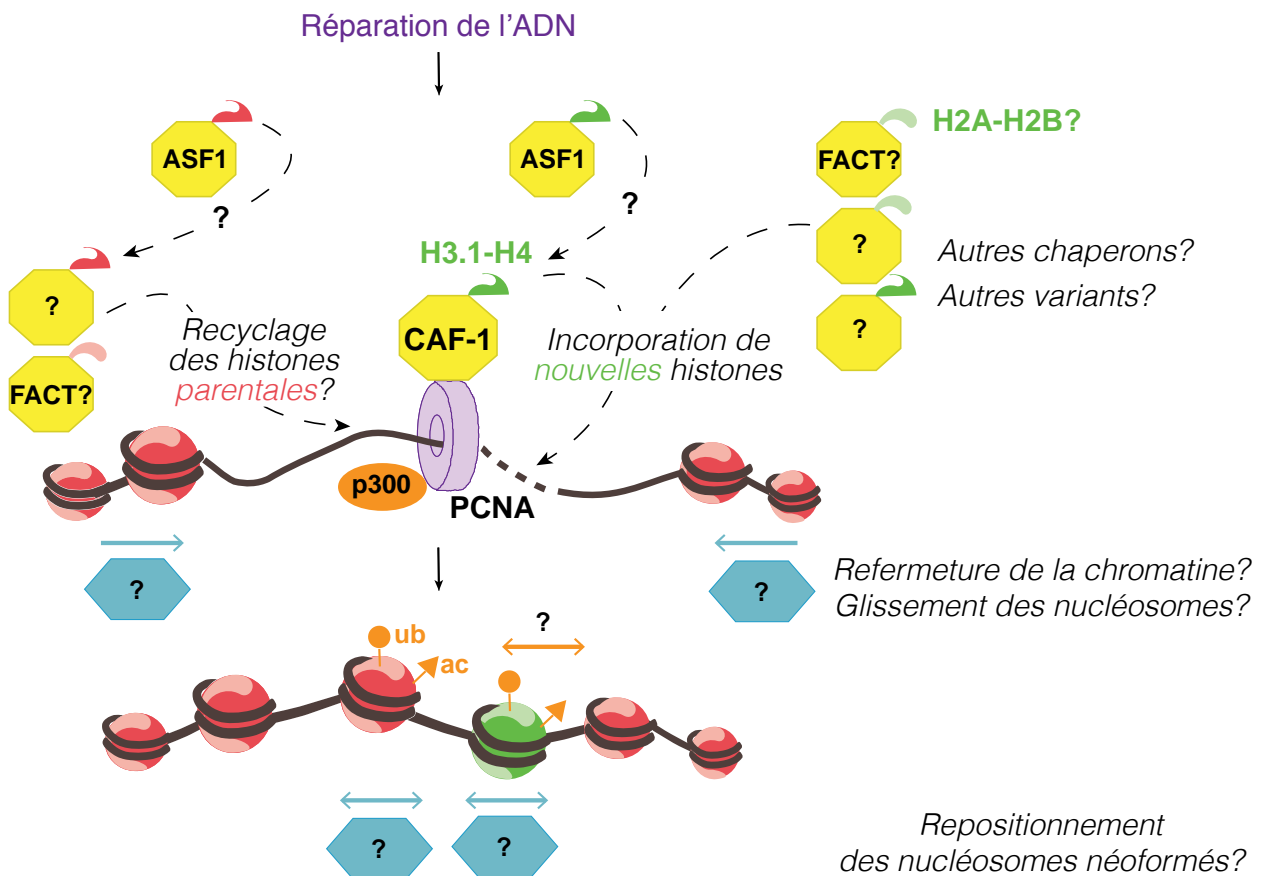


Figure 19 : Modèle illustrant la dynamique des histones couplée aux étapes tardives de la réparation NER. De nouvelles histones H3.1 et H2A (vert, probablement en dimères avec de nouvelles H4 et H2B) sont incorporées aux sites de dommages UVC par l'action respective des chaperons d'histones (jaune) CAF-1 et vraisemblablement FACT (il reste aussi à déterminer le lien entre incorporation de nouvelles H2A et réparation NER). En complément de la mise en place de nouvelles histones, la restitution de l'organisation de la chromatine pourrait aussi nécessiter un recyclage des histones parentales (rouge) par des chaperons d'histones (avec ASF1 et FACT comme candidats intéressants), une re-fermeture de la chromatine et/ou un glissement des nucléosomes par des facteurs de remodelage de la chromatine (bleu). Mais ceci reste à démontrer, tout comme le rôle potentiel des modifications (orange) de H2A (ub) et de H3 (ac par p300) dans le repositionnement des nucléosomes néoformés, action probablement coordonnée avec celle des facteurs de remodelage. Version remise à jour du modèle présenté en Annexe 3.

La mise en place *de novo* d'histones aux sites de lésions a été initialement révélée par des analyses de la dynamique du variant répliatif H3.1, 20 h après transfection transitoire dans des cellules humaines soumises à une irradiation locale aux UVC (Polo et al., 2006). L'utilisation d'une approche similaire a permis de démontrer que de nouvelles histones H2A sont aussi incorporées dans la chromatine endommagée, probablement par le chaperon FACT (Dinant et al., 2013). L'incorporation de H3.1 sur de l'ADN endommagé est assurée par le chaperon CAF-1 *in vitro* et *in vivo* (Polo et al., 2006; Tagami et al., 2004), et est couplée à la synthèse réparatrice. En effet, dans les cellules humaines, CAF-1 s'accumule aux sites de lésions au cours des étapes finales du NER (Green and Almouzni, 2003; Martini et al., 1998), grâce à une interaction directe entre CAF-1 et PCNA (Moggs et al., 2000). Néanmoins, CAF-1 n'est requis ni pour la réparation des dommages CPD et 6-4PP ni pour l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire post irradiation aux UVC (Polo et al., 2006), ce qui est cohérent avec une fonction de CAF-1 limitée à la restitution de l'architecture nucléosomale après réparation des dommages. Vu que CAF-1 escorte à la fois les variants répliatifs H3.1 et H3.2 (Latreille et al., 2014), il est fort possible que des histones H3.2 néo-synthétisées soient également incorporées dans la chromatine réparée. De plus, le chaperon ASF1 pourrait contribuer à la mise en place *de novo* de variants de H3 (**Figure 19**), car il assure, de concert avec CAF-1, l'assemblage des nucléosomes au cours du NER *in vitro* (Mello et al., 2002) et aide à éteindre les points de contrôle du cycle cellulaire chez la levure et dans les cellules humaines (Battu et al., 2011; Kim and Haber, 2009).

D'autres variants d'histones se retrouvent enrichis aux sites de cassures double brin de l'ADN (cf. **Annexe 4**) et sont donc susceptibles de s'accumuler dans la chromatine endommagée aux UVC, peut être sous leur forme néo-synthétisée, même si aucune preuve d'une telle accumulation n'existe à ce jour. La plupart de ces variants contribuent à une réparation efficace des cassures, ce qui suggère qu'ils auraient plutôt un rôle précoce au cours du processus de réparation. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la dynamique du variant de remplacement H3.3 et de ses chaperons après irradiation aux UVC, car le complexe HIRA, un chaperon d'histone dédié à H3.3, s'accumule aux sites de cassures (Adamson et al., 2012) où il assure la mise en place de H3.3 dans les cellules humaines (Yang et al., 2013). Un mécanisme similaire pourrait intervenir dans la chromatine endommagée aux UVC, sachant qu'une perte d'expression de H3.3 rend les cellules de poulet hyper-sensibles aux UVC (Frey et al., 2014) et que dans les cellules humaines, les protéines du NER, DDB1 et CUL4A, sont requises pour une incorporation globale efficace de H3.3 (Han et al., 2013). Cependant, des expériences *in vitro* n'ont pas réussi à révéler une incorporation de H3.3 par HIRA en réponse à un stress génotoxique. En effet, des extraits d'œufs de *Xenopus* dans lesquels HIRA a été immuno-retiré conservent leur capacité à assembler des nucléosomes sur des plasmides irradiés aux UVC (Ray-Gallet et al., 2002) et aucune incorporation de H3.3 est détectée sur de l'ADN endommagé aux UVC *in vitro* (Tagami et al., 2004). Cependant, ces résultats sont à

prendre avec précaution, car ils ne mettent en lumière que des réactions qu'il est possible de récapituler *in vitro* sur de l'ADN nu.

Enfin, l'incorporation de nouvelles histones dans la chromatine réparée n'est sans doute pas le seul mécanisme assurant la restitution de l'architecture nucléosomale. Cette dernière pourrait ainsi nécessiter un recyclage des variants d'histones parentaux, un repositionnement des nucléosomes néoformés et/ou une re-fermeture de la structure chromatinienne (**Figure 19**). Mais leur contribution respective n'a pas été encore analysée. Les chaperons FACT et ASF1 pourraient participer au recyclage des anciennes histones puisque le premier assure une mobilité accrue de H2A aux sites de dommages induits par les UVC (Dinant et al., 2013), et le second serait impliqué dans le retour des histones après le passage de la fourche de réplication de l'ADN (Groth et al., 2007a). Quant aux facteurs de remodelage de la chromatine, BRG1 s'accumule tardivement aux sites de lésions (Zhang et al., 2009), et pourraient donc aider à la redistribution des nucléosomes au sein de la chromatine réparée.

L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence que la chromatine est une structure très dynamique, ce qui assure une réparation efficace des dommages de l'ADN. Néanmoins, cette plasticité en réponse à un stress génotoxique a une fonction additionnelle, qui est de participer à toutes les étapes de la régulation de la transcription post irradiation aux UVC (**Figures 20 & 21**).

3.4. Dynamique de la chromatine endommagée par les UVC et régulation de son activité transcriptionnelle

Longtemps, le rôle des réarrangements de la chromatine induits par les UVC dans le contrôle de la transcription post dommages a été spéculatif. Or, depuis quelques années, un regain d'intérêt pour cette problématique est visible au sein de la communauté scientifique, et même si beaucoup de chemin reste à faire, de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes épigénétiques contrôlant la régulation de la transcription UVC-induite ont été réalisées dans les cellules de mammifères. Ceci est également vrai en réponse à d'autres agents génotoxiques (cf. **Annexe 1**).

3.4.1. Plasticité de la chromatine associée à l'inhibition de la transcription

Je vous ai décrit dans la partie 1.3.1 que la diminution de la transcription post irradiation aux UVC est principalement due à un blocage passif de l'ARNPII sur la lésion. Mais, l'initiation de la transcription est aussi inhibée, sûrement pour éviter un engorgement du site endommagé par un amoncellement d'ARNPII, ce qui pourrait compliquer la détection du dommage par la machinerie TC-NER. Un changement de profil de modifications post-

traductionnelles des histones au niveau des promoteurs de gènes du cycle cellulaire a ainsi été identifié après irradiation aux UVC dans les cellules de mammifères (**Tableau 6 & Figure 20**). La baisse UVC-induite d'expression de ces gènes corrèle avec un décrochage des enzymes de modification GCN5 et Chk1 du promoteur, et donc avec une diminution du niveau respectif d'acétylation de H3K9 et de phosphorylation de H3T11 (Shimada et al., 2008). La perte de cette dernière marque d'histone dans la chromatine endommagée est renforcée grâce à l'activité de la PP1 γ , phosphatase nécessaire pour la réduction du nombre d'ARNs messagers de *cdk1*, *cyclines A2* et *B1* en réponse aux UVC (Shimada et al., 2010). La kinase ATR activée par les UVC contrôle à la fois le décrochage de Chk1 et l'activation de PP1 γ , via la phosphorylation de ces facteurs (Shimada et al., 2008; 2010) et serait donc un facteur clé de l'inhibition de la transcription des gènes régulant le cycle cellulaire. Cependant, des études complémentaires devront déterminer si ce mécanisme d'inhibition est généralisable à d'autres gènes.

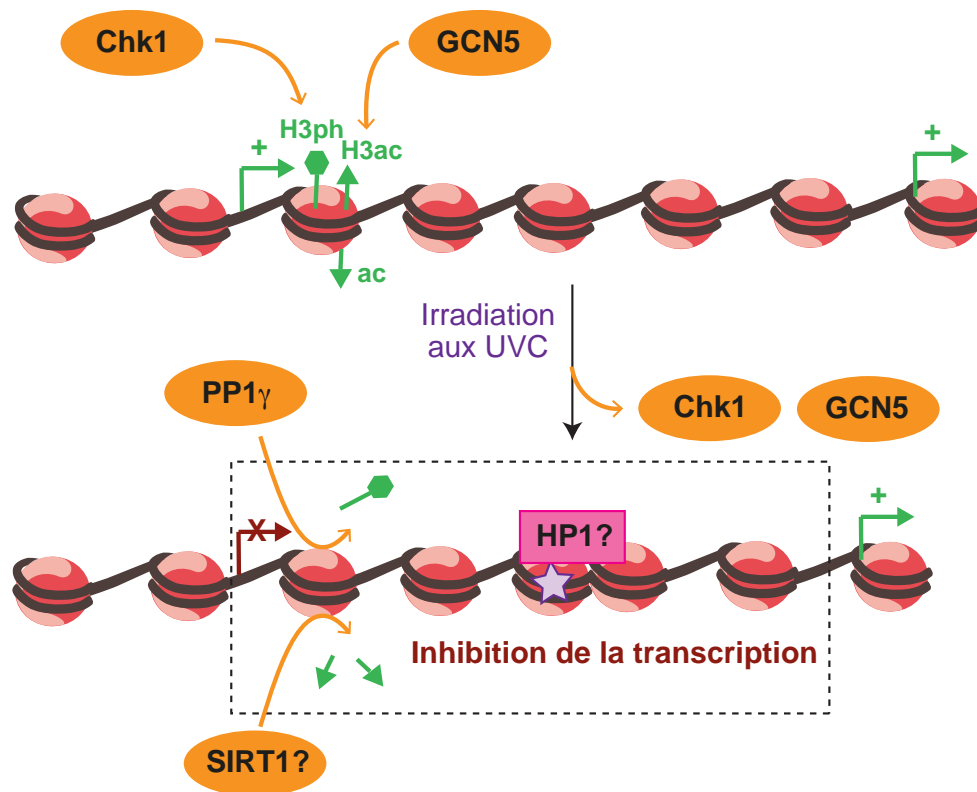


Figure 20 : Modèle illustrant la plasticité de la chromatine associée à la baisse d'expression des gènes endommagés. Des enzymes de modification des histones (en orange) et des protéines architecturales de la chromatine (en rose) sont probablement impliquées dans l'inhibition de la transcription après dommages générés par les UVC (étoile violette). Les marques d'histones associées à l'activation transcriptionnelle ont été représentées en vert. Les modifications UVC-induites autre que celles des histones n'ont pas été schématisées par souci de clarté. ac: acétylation, ph: phosphorylation. Voir texte pour plus de détails.

L'histone dé-acétylase SIRT1 (Sirtuin 1) serait une autre enzyme de modification d'histones impliquée dans la suppression de la synthèse d'ARN en réponse à une irradiation

aux UVC (**Figure 20**). Mais son implication en réponse aux UVC n'a pour l'instant été révélée que dans des fibroblastes humains déficients en réparation NER (Vélez-Cruz et al., 2013), contrairement à ce qui a pu être observé après cassure double brin de l'ADN ou stress oxydatif (O'Hagan et al., 2008; 2011). Des données récentes ont aussi dévoilé que l'acétyl-transférase TIP60 participe indirectement à l'inhibition de la transcription aux sites de cassures de l'ADN (Gong et al., 2015). En effet, TIP60 acétyle l'histone H4 dans les régions de chromatine lésées, cette acétylation servant de plateforme de recrutement pour diverses protéines dont le complexe NuRD (Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation), ce qui permettrait d'éteindre la transcription. TIP60, étant également impliqué dans l'acétylation des histones après irradiation aux UVC (Cheng et al., 2008), il serait donc intéressant de déterminer si cette acétyl-transférase contribue à arrêter la transcription en réponse aux lésions UVC, suivant un mécanisme similaire à celui identifié après cassures de l'ADN.

Enfin, la protéine d'hétérochromatine HP1 est recrutée aux sites de dommages générés par les UVC dans les cellules de mammifères et la perte d'expression de HP1 chez *C.elegans* sensibilise les vers à une irradiation aux UVB (Luijsterburg et al., 2009). Ces résultats suggèrent que la chromatine à proximité de la lésion pourrait être hétérochromatinisée grâce à l'arrivée de HP1 avec comme conséquence un arrêt de la transcription (**Figure 20**). Cette hypothèse nécessite néanmoins d'être confirmée ou infirmée dans le futur. Plus généralement, c'est l'importance de la dynamique de la chromatine dans le contrôle de l'inhibition de la transcription post irradiation aux UVC qui devrait être le focus de recherches ultérieures.

3.4.2. Plasticité de la chromatine associée à la reprise de la transcription ou au TC-NER

Les facteurs cellulaires impliqués dans le TC-NER et/ou la reprise de la transcription ont généralement comme caractéristiques que leur perte de fonction conduit à une hypersensibilité modérée aux UVC et à un défaut de redémarrage de la production d'ARN dans les heures qui suivent l'irradiation aux UVC. Mais, cette perte de fonction n'entraîne pas d'altération globale de la cinétique de disparition des lésions CPD et/ou de la synthèse réparatrice d'ADN (mesurée par incorporation d'analogues de dNTP dans les cellules hors S) car les cellules déficientes dans la reprise de la transcription sont toujours capables de réparer les dommages par la voie GG-NER sauf si les facteurs testés sont aussi requis dans cette voie. Ainsi, par étude de perte de fonction, des facteurs de remodelage de la chromatine, des protéines non-histones, des chaperons et des enzymes de modification d'histones ont été récemment identifiés comme facilitant le redémarrage de l'expression des gènes endommagés (**Figure 21**).

Tout d'abord, CSB, facteur de la voie TC-NER, possède un domaine ATPase SWI/SNF capable de remodeler la chromatine *in vitro* (Citterio et al., 2000). Cette activité de remodelage est stimulée par les chaperons d'histones NAP1 et NAP2. En outre, la

surexpression de NAP2 dans des fibroblastes humains mutés pour la protéine CSB diminuent la sensibilité de ces cellules aux UVC, confortant un rôle de NAP2 dans le TC-NER (Cho et al., 2013). Cependant, l'importance de l'activité de remodelage de CSB *in vivo* et les substrats potentiellement visés par CSB sont encore inconnus (**Figure 21**).

Concernant les chaperons d'histones, FACT est recruté aux sites de dommages indépendamment des facteurs de réparation et même dans des cellules préalablement traitées avec un inhibiteur de transcription. Mais il assure la reprise de la transcription post UVC dans les cellules humaines (Dinant et al., 2013). Il rend également les histones H2A-H2B plus mobiles dans la chromatine endommagée, mais si c'est cette fonction qui permet le redémarrage de la synthèse d'ARN reste à déterminer (**Figure 21**). En plus d'accélérer l'échange d'histones, recruter des facteurs de remodelage de la chromatine peut représenter un autre moyen de déstabiliser la structure de la chromatine. En accord avec cette idée, les facteurs de remodelage de la famille ISWI, ACF et WICH (Williams syndrome transcription factor - ISWI Chromatin remodeling complex) favorisent la reprise de l'activité transcriptionnelle post irradiation aux UVC dans des cellules humaines (Aydin et al., 2014) (**Figure 21**). Ces complexes interagissent avec le facteur CSB (Aydin et al., 2014; Cavellán et al., 2006) et s'accumulent aux sites de lésions de l'ADN pour y faciliter l'enrichissement de CSB et probablement la poursuite de la réparation TC-NER. Une analyse poussée du recrutement de la sous-unité catalytique de ces complexes, SMARCA5 (SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily A, member 5) a permis de démontrer que ce recrutement, indépendant des facteurs du NER, est diminué par traitement des cellules avec un inhibiteur d'histone méthyl-transférases (Adenosine di-aldehyde), d'histone déacétylases (Trichostatine A, TSA) ou de transcription (α -amanitine ou DRB, 5,6-dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside) (Aydin et al., 2014). De plus, SMARCA5 est initialement enrichi au centre de la région endommagée avant de se relocaliser en périphérie, ce qui pourrait indiquer que SMARCA5 assure un déplacement directionnel des nucléosomes afin de les éloigner du site de lésions. Enfin, le facteur de remodelage BRG1, membre de la famille de SWI/SNF, est recruté au niveau des promoteurs de gènes de réponse au stress après irradiation aux UVC, et stimule l'expression de ces gènes dans les cellules humaines (Gong et al., 2008; Zhang et al., 2014). De manière équivalente, après irradiation aux UVB de fibroblastes embryonnaires de souris, H3.3, sous le contrôle de l'histone méthyl-transférase WHSC1, s'accumule sur les régions codantes des gènes induits par les UV (Sarai et al., 2013). Il serait donc intéressant d'analyser si BRG1 et WHSC1 ont un rôle plus global dans la régulation de la synthèse d'ARN après dommages de l'ADN.

La perte de la protéine architecturale HMG1 (High Mobility Group Nucleosome binding domain 1) dans les fibroblastes murins conduit à une baisse de la réparation des dommages CPD au niveau des gènes transcriptionnellement actifs (Birger et al., 2003). Des

expériences d'immuno-précipitation de chromatine ont permis de mettre en évidence que HMGN1 interagit avec l'ARNPII et la protéine TC-NER UVSSA grâce aux facteurs de réparation CS (Fousteri et al., 2006; Schwertman et al., 2012). Cependant, le mode de fonctionnement de HMGN1 dans le TC-NER n'a pas encore été déterminé. Des expériences de FRAP ont démontré que HMGN1 entre en compétition avec l'histone lien H1 pour se fixer sur les nucléosomes dans les cellules de souris (Catez et al., 2002), et serait susceptible ainsi de promouvoir l'ouverture de la chromatine en amont de l'ARNPII bloquée pour faciliter sa translocation en arrière (**Figure 21**). Cette déstabilisation de la chromatine pourrait être renforcée par le fait que HMGN1 stimule l'activité acétyl-transférase de PCAF (P300/CBP-Associated Factor) sur l'histone H3 nucléosomale (Lim et al., 2005). Néanmoins, un rôle plus tardif de HMGN1 dans le TC-NER n'est pas à exclure car cette protéine accélère le recrutement de PCNA dans la chromatine *in vitro* et *in vivo* (Postnikov et al., 2012).

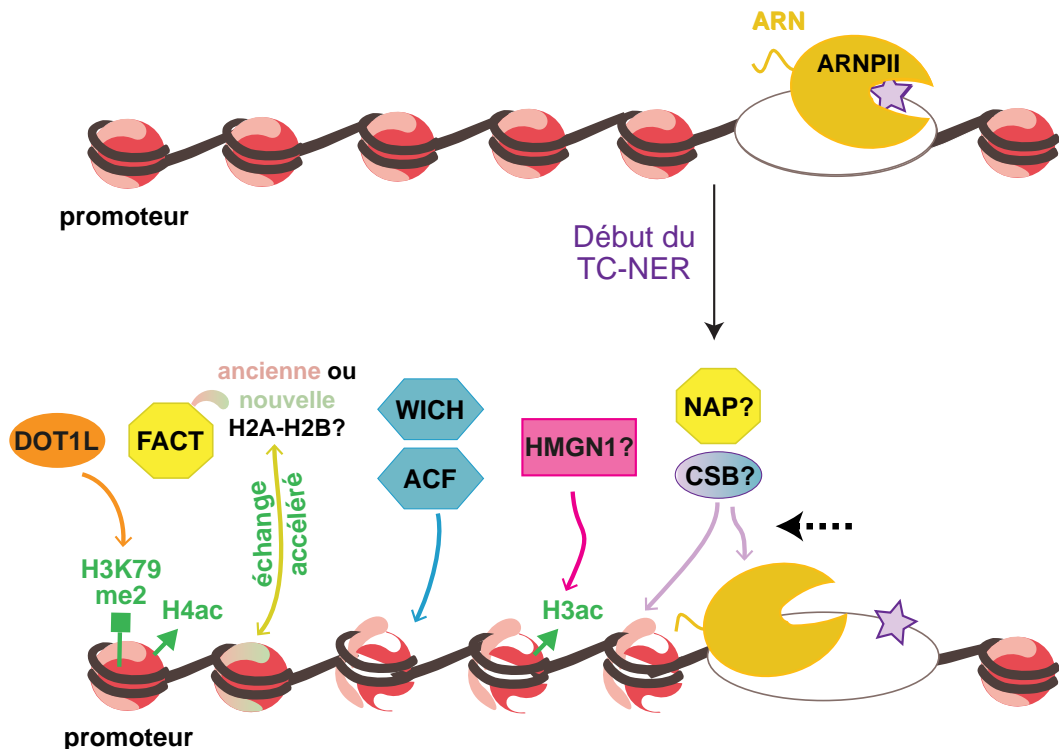


Figure 21 : Modèle illustrant l'impact de la dynamique de la chromatine sur la reprise de la transcription post irradiation aux UVC. En complément des facteurs du TC-NER (en violet), des enzymes de modification des histones (en orange), des chaperons d'histones (en jaune), des facteurs de remodelage (en bleu) et des protéines architecturales de la chromatine (en rose) sont probablement nécessaires pour déstabiliser la chromatine et/ou l'ARNPII bloquée et ainsi permettre à cette dernière de faire « marche arrière ». La réparation de la lésion (étoile violette) est ensuite assurée par TC-NER. Quant à DOT1L, son activité méthyltransférase au niveau des promoteurs géniques devrait permettre de redémarrer la synthèse d'ARN après réparation. Les marques d'histones associées à l'activation transcriptionnelle ont été représentées en vert. L'effet de HMGN1 sur la dynamique de l'histone lien H1 n'a pas été schématisé. ac: acétylation, me: méthylation. Données tirées des revues (Marteijn et al., 2014; Spivak and Ganesan, 2014).

Quant aux enzymes de modifications des histones, la première identifiée comme jouant un rôle potentiel dans le TC-NER est l'acétyl-transférase p300. Le lien entre p300 et TC-NER ne repose actuellement que sur le fait que l'interaction de p300 avec l'ARNPII dans la chromatine est stimulée par les UVC de manière CSB-dépendante (Fousteri et al., 2006). Cependant, il sera difficile de déchiffrer la fonction de p300 dans le TC-NER, car p300 semble déjà réguler de nombreux aspects de la réparation GG-NER (**Tableau 6**). La H3K79 méthyl-transférase DOT1L (Disruptor of Telomeric silencing-1 like) a par contre une fonction plus caractérisée en réponse à une irradiation aux UVC dans les cellules murines (**Tableau 6 & Figure 21**). En absence de DOT1L, le redémarrage de la transcription est altéré. Mais cette inhibition est levée par traitement des cellules avec l'inhibiteur d'histone dé-acétylase TSA (Oksenysh et al., 2013), ce qui suggère que DOT1L assurerait la reprise de la synthèse d'ARN en favorisant l'établissement d'une structure ouverte de la chromatine, permissive pour la transcription. En accord avec cette hypothèse, les cellules déficientes en DOT1L présentent un défaut d'accumulation de marques d'histones classiquement associées à l'activation transcriptionnelle (H3K79me2 & H4ac), et un enrichissement en marques d'hétérochromatine (H3K9me2) au niveau des promoteurs des gènes de ménage réprimés par les UVC (Oksenysh et al., 2013).

En conclusion, de nombreux facteurs de la dynamique de la chromatine ont été récemment identifiés comme contrôlant la reprise de la transcription après irradiation aux UVC. Cependant, leur mode de fonctionnement reste encore éluif. En particulier, il serait important de déterminer quand ces facteurs sont importants, soit au cours du TC-NER afin de faciliter le déplacement en arrière de l'ARNPII bloqué et ainsi la réparation des dommages, soit *a posteriori* dans la reprise de l'activité transcriptionnelle indépendamment de la réparation (**Figure 6**). D'autre part, je vous ai illustré dans cette partie que la chromatine subit de remarquables changements en réponse à un stress génotoxique et ces réarrangements mettent en péril le maintien de la structure et de la fonction transcriptionnelle de la chromatine.

PROBLEMATIQUE

*Maintien de l'information épigénétique
après stress génotoxique ?*

1. Questions et méthodologies

Dans la partie précédente, je vous ai illustré que la réparation des dommages de l'ADN induits par les UVC s'accompagne notamment de modifications covalentes des histones préexistantes, de la perte de densité d'histones incorporées et de la mise en place d'histones néo-synthétisées (**Tableau 6, Figures 17-21**), ces dernières présentant un profil de marques post-traductionnelles qui leur sont propres (Alabert et al., 2015; Loyola et al., 2006). Donc, après induction de lésions de l'ADN, la composition de la chromatine apporte, au moins transitoirement, de nouvelles informations, qui permettent aux cellules de répondre efficacement à une attaque génotoxique, mais qui mettent aussi en péril l'intégrité structurale et fonctionnelle de la chromatine (cf. **Annexe 4**). Afin de maintenir cette intégrité, une mémoire de l'information originale véhiculée par la chromatine doit être préservée. Cependant, comment cette mémoire est-elle maintenue après induction de lésions de l'ADN est une question qui n'a pas encore été complètement élucidée par la communauté scientifique. En effet, dans la littérature, **deux modèles alternatifs de restitution de l'architecture chromatinienne en réponse aux dommages de l'ADN** ont été proposés (cf. **Annexe 4**) :

– **L'organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine serait restituée fidèlement.** Dans ce modèle, les nouvelles informations portées par la chromatine endommagée ne seraient présentes que transitoirement afin de faciliter la signalisation, la réparation des lésions de l'ADN et la régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes. Les informations portées initialement par la chromatine seraient alors recyclées par retour des variants parentaux « déplacés » et par élimination active des marques apposées sur les histones au cours de la réparation des dommages de l'ADN.

– **La chromatine restituée conserverait, au moins en partie, les nouvelles informations apportées au cours de la réparation des lésions de l'ADN.** Dans ce cas, les nouvelles informations laisseraient une empreinte sur la chromatine ayant été endommagée, qui pourrait servir de mémoire des dommages subis par la cellule, facilitant ainsi la réparation en cas d'une nouvelle exposition à un agent génotoxique.

Cependant, il est impossible de favoriser l'une ou l'autre de ces deux hypothèses en l'état actuel des données, car **la contribution relative d'informations nouvelles vs parentales au sein de la chromatine réparée n'a pas encore été évaluée.** Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai décidé d'analyser cette contribution par **étude mécanistique et fonctionnelle de la dynamique des variants de l'histone H3 parentaux et néo-synthétisés en réponse aux dommages induits par les UVC dans les cellules humaines.** Les variants de l'histone H3 représentent un modèle de choix pour cette étude, car ils constituent l'un des vecteurs clé

de l'information épigénétique mais leur dynamique en réponse à un stress génotoxique était assez peu caractérisée. En outre, disséquer cette dynamique et son importance fonctionnelle constitue une première étape indispensable afin de mieux comprendre la physiologie des tumeurs associées à des formes mutantes des histones H3 (cf. introduction partie 2.3.4).

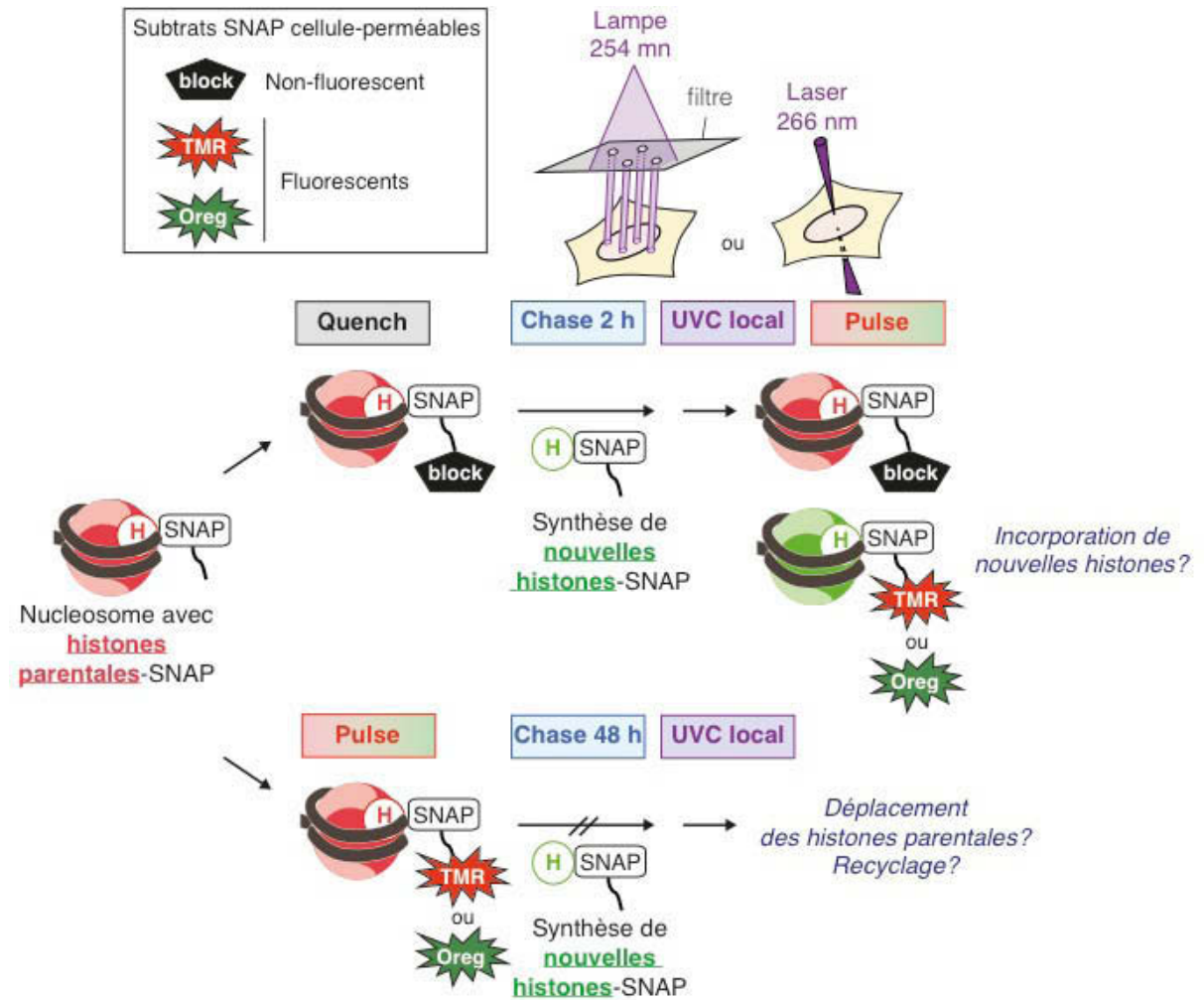


Figure 22 : Analyse de la dynamique des histones H3 après irradiation locale aux UVC par la technologie SNAP. *Haut* : expérience de « quench-chase-pulse ». En rendant non fluorescentes les histones préexistantes avec le réactif block, seules les histones néo-synthétisées pendant la période de chasse sont marquées (soit en rouge avec le Tétra-Méthyl-Rhodamine star (TMR), soit en vert avec l'Oregon green (Oreg)). *Bas* : expérience de « pulse-chase ». En réalisant le marquage 48 h avant l'expérience d'irradiation locale aux UVC (lampe 254 nm + filtre percé de micropores ou micro-irradiation laser 266 nm), seule la dynamique des histones parentales est étudiée.

Pour analyser spécifiquement la dynamique des histones H3 parentales et néo-synthétisées en réponse aux dommages induits par les UVC, j'ai principalement mis à profit deux méthodologies innovantes utilisées dans mes laboratoires d'accueil, **la technologie SNAP** (Bodor et al., 2012) et **l'irradiation locale aux UVC** (Dinant et al., 2007; Katsumi et al., 2001; Moné et al., 2001) (**Figure 22**). En effet, nous disposons de lignées cellulaires

humaines stables (cellules tumorales U2OS et HeLa), exprimant à des niveaux modérés les histones H3.1, H3.3, CENP-A fusionnées à l'étiquette SNAP (Dunleavy et al., 2011; Ray-Gallet et al., 2011). Cette étiquette, qui se fixe de manière covalente à des dérivés de benzyl-guanine qu'ils soient fluorescents (TMR star, Oregon green) ou non (block) (Bodor et al., 2012) (**Figure 22**), permet de suivre le devenir de protéines étiquetées dans les cellules. La technique SNAP a notamment été très employée dans une des mes équipes d'accueil pour suivre la dynamique des variants de l'histone H3 dans les cellules humaines (Dunleavy et al., 2011; Ray-Gallet et al., 2011) car elle permet de visualiser spécifiquement soit des histones néo-synthétisées (expérience de « quench-chase-pulse», haut de la **Figure 22**) soit des histones parentales (« expérience de pulse-chase », bas de la **Figure 22**).

J'ai ensuite couplé cette technique innovante de marquage des histones à une irradiation localisée des cellules aux UVC, en utilisant deux méthodes complémentaires (**Figure 22**). Tout d'abord, j'ai employé une technique classique d'irradiation locale aux UVC, utilisant une lampe 254 nm irradiant à travers un filtre de polycarbonate percé de micropores (Katsumi et al., 2001; Moné et al., 2001). Pour plus de détails, je vous renvoie à l'**Annexe 5**, article de méthodes que j'ai co-écrit et qui explicite le protocole expérimental permettant de suivre spécifiquement les histones néo-synthétisées après ce type d'induction localisée de lésions. En outre, j'ai participé à la mise au point d'un système puissant de micro-irradiation laser UVC (266 nm). Ce système, qui a été installé pendant ma thèse sur la plateforme d'imagerie de mon laboratoire d'accueil à l'Institut Curie, est rare (il en existe deux dans le monde) et coûteux car il nécessite un microscope confocal équipé d'un laser UVC et une optique tout en quartz (Dinant et al., 2007). Cependant, il présente l'avantage de permettre un ciblage des zones à irradier et l'analyse en temps réel de réponses cinétiques rapides sur cellules vivantes. Ainsi, l'utilisation combinée de l'ensemble de ces méthodologies novatrices m'a permis de suivre *in vivo* la dynamique des histones préexistantes et néo-synthétisées en réponse aux lésions de l'ADN générées par les UVC.

2. Objectifs de la thèse

Quand j'ai débuté ma thèse, nous ne disposions que de très peu d'éléments concernant la dynamique des formes néo-synthétisées de variants de l'histone H3 en réponse à une irradiation locale aux UVC dans les cellules de mammifères, seule la mise en place *de novo* du variant réplicatif H3.1 ayant été rapportée par mon laboratoire d'accueil dans les cellules humaines (Polo et al., 2006). Cependant, cette incorporation n'exclut pas la mise en place concomitante d'autres nouveaux variants de l'histone H3. Ainsi, **le premier objectif de ma thèse consiste à analyser la dynamique des variants principaux de l'histone H3, à savoir les variants de remplacement H3.3 et CENP-A, aux sites de dommages de l'ADN induits par les UVC et d'en déterminer les mécanismes sous-jacents (Figure 23)**. Ayant mieux

caractérisé la dynamique des nouvelles histones H3 dans les régions de chromatine endommagées, **mon second objectif est de comprendre l'importance fonctionnelle de cette dynamique** : est-elle requise pour une signalisation et une réparation efficaces des dommages induits par les UVC ? A-t-elle un rôle purement structural, de restitution de l'organisation nucléosomale de la chromatine ? Ou est-elle impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des cellules par les UVC, de manière analogue à ce qui a été suggéré pour l'histone H2A (Dinant et al., 2013) (**Figure 23**) ?

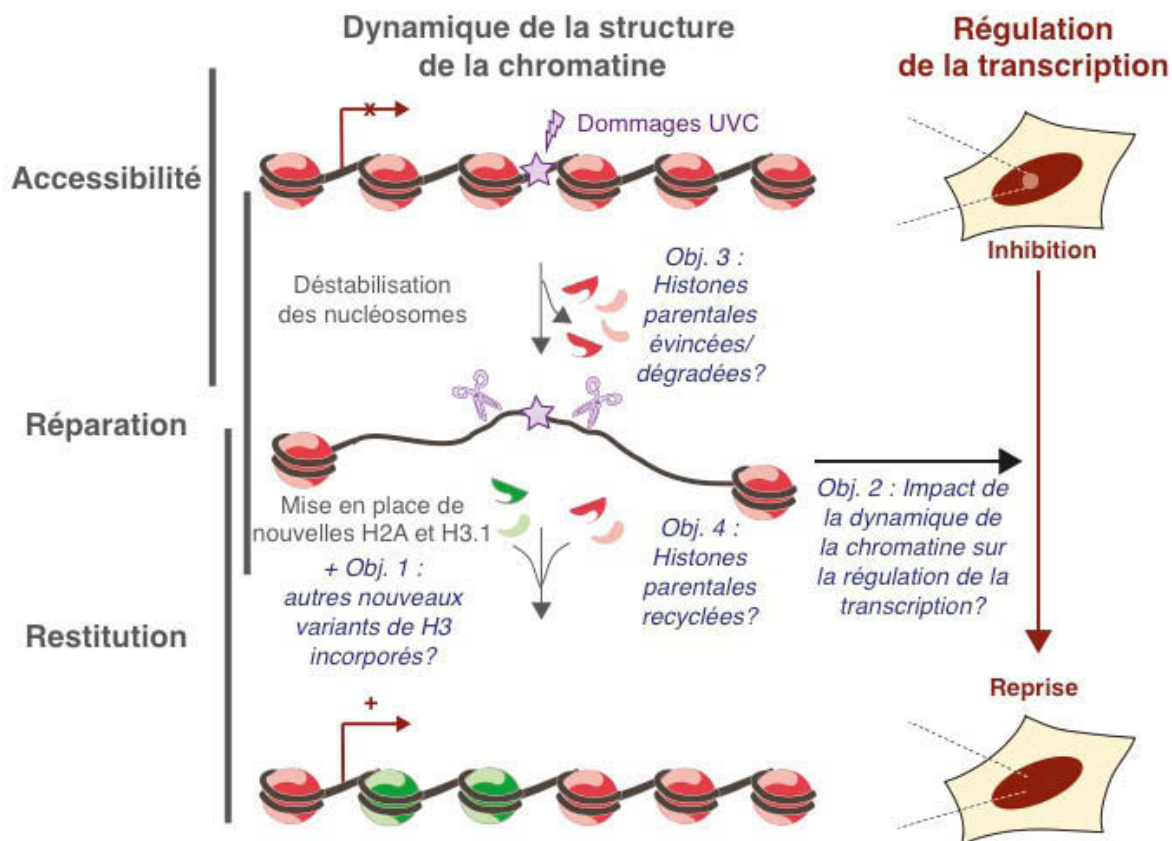


Figure 23 : Modèle de la dynamique des histones parentales et néo-synthétisées après irradiation locale aux UVC : questions soulevées au cours de ma thèse. Ce modèle illustre la plasticité de la structure de la chromatine en parallèle de la régulation de son activité transcriptionnelle en réponse à une irradiation localisée aux UVC. Les questions qui restent ouvertes et auxquelles j'ai cherché à répondre au cours de ma thèse sont indiquées en bleu. Obj. : Objectif.

La mise en place de nouvelles histones aux sites de lésions soulève la question du devenir des histones parentales. Je me suis donc intéressée à comparer la dynamique des anciennes et des nouvelles histones H3 aux sites de dommages de l'ADN induits par les UVC. Nos connaissances des mécanismes contrôlant la désorganisation précoce de la chromatine en réponse aux lésions de l'ADN sont encore limitées (cf. introduction partie 3). Ainsi mieux comprendre la dynamique des histones parentales dans les régions de chromatine endommagées par les UVC devrait permettre de répondre aux interrogations suivantes : sont-

elles véritablement évincées voire dégradées, et dans ce cas, l'information parentale qu'elles véhiculent serait perdue ? Sont-elles simplement redistribuées à proximité des dommages de l'ADN ? Ou la chromatine est-elle désorganisée de manière plus globale (Rubbi and Milner, 2003) ? **Déterminer le devenir à court terme des histones H3 parentales après irradiation localisée aux UVC, ainsi que les mécanismes contrôlant ce devenir correspond au troisième objectif de ma thèse (Figure 23).** Enfin, dans un quatrième objectif, nous nous sommes focalisées sur **le devenir à plus long terme des histones parentales et néo-incorporées dans les régions de chromatine lésées par les UVC après réparation des lésions** : les histones préexistantes « déplacées » des sites de dommages sont-elles recyclées à ces sites, ce qui permettrait de restituer, au moins partiellement, l'information initialement portée par la chromatine ? Les histones néo-incorporées sont-elles conservées, ce qui favoriserait l'hypothèse d'un système de mémoire des dommages subis par la cellule ?

Dans le chapitre suivant, je vais maintenant vous exposer le travail de recherche réalisé au cours de ma thèse. Cette présentation des articles scientifiques que j'ai écrits explicitera les résultats clés répondant à chacun des objectifs énoncés ci-dessus. Concernant la partie expérimentale, je vous renvoie aux méthodologies que nous avons exposées en **Annexes 3 et 5** ainsi qu'aux sections « Matériels & Méthodes » de chaque publication. Chaque sous-partie se terminera par une discussion des données présentées. Quant aux perspectives apportées par mon travail de thèse, elles seront détaillées dans la partie suivante.

RESULTATS

1. Mise en place précoce de nouvelles histones H3.3 par le complexe chaperon HIRA dans les régions de chromatine endommagées par les UVC

Article scientifique :

Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA.

Le processus de reprise de la transcription après dommages de l'ADN nécessite un système de marquage de la chromatine dépendant du chaperon HIRA, chaperon d'histone dédié à H3.3.

Salomé Adam, Sophie E. Polo, Geneviève Almouzni

Cell, 155 : 94-106, 2013

1.1. Dynamique des variants de l'histone H3 néo-synthétisés aux sites de lésions induites par les UVC

En mettant à profit l'approche expérimentale décrite dans la partie précédente (**Figure 22**), j'ai confirmé l'**incorporation de nouvelles histones H3.1** (Polo et al., 2006) et également visualisé **la mise en place de nouvelles histones H3.3** aux sites de dommages générés par les UVC dans des cellules humaines (U2OS (**Figure 3**) et HeLa) 45 minutes après irradiation localisée aux UVC. Cette accumulation locale de nouveaux variants H3.3 est détectable dans la majorité des cellules endommagées, qu'elles soient en G1, S ou G2 (**Figure S2**). En outre, nous avons analysé en temps réel la cinétique d'enrichissement de nouvelles H3.3 par micro-irradiation laser UVC, et nous avons observé que cet enrichissement commence à être détecté dans la demi-heure qui suit l'irradiation (**Figure S2**). Cependant, cette accumulation n'est pas généralisable à l'ensemble des variants de l'histone H3 car le variant centromérique **CENP-A néo-synthétisé ne présente pas d'enrichissement** détectable aux sites de lésions induites par les UVC (**Figure 3**).

1.2. Aspects mécanistiques

Nous avons ensuite cherché à déterminer les mécanismes contrôlant la mise en place de nouveaux variants H3.3 dans la chromatine lésée. Cette recherche mécanistique s'est déroulée en deux temps : (1) identification du ou des chaperons d'histones H3 responsable(s) de l'enrichissement de nouvelles H3.3 dans la chromatine endommagée et (2) analyse de la dépendance de cet enrichissement vis à vis de la réparation des dommages par la voie NER.

Pour cette étude, j'ai d'abord analysé par immunofluorescence le recrutement de chaperons d'histones H3 aux sites de lésions induites par les UVC 30 minutes après irradiation locale (**Figure 2**). Ni les chaperons de H3, ASF1a, ASF1b, NASP ni le chaperon dédié à H3.3, DAXX ne présentent d'enrichissement détectable aux sites de dommages produits par les UVC dans les cellules U2OS. Néanmoins, en accord avec ce qui a été observé après cassures de l'ADN (Adamson et al., 2012), **les sous-unités HIRA, UBN1 et CABIN1** du complexe chaperon HIRA, chaperon spécifique de H3.3, **sont recrutées** dans les régions de chromatine irradiées aux UVC. Comme pour les nouvelles histones H3.3, le recrutement de la protéine HIRA aux sites de lésions est visualisable dans la majorité des cellules endommagées dans les différentes phases du cycle cellulaire. De plus, ce recrutement, a lieu à la fois dans des cellules tumorales et dans des fibroblastes primaires humains (**Figure S2**). L'utilisation d'une approche ARN interférence permettant de diminuer l'expression de chacune des sous-unités du complexe HIRA a établi que la sous-unité CABIN1 stimule la relocalisation de la protéine HIRA au niveau des sites de lésions de l'ADN (**Figures S2 & S4**). Puis, j'ai appliqué une même approche ARN interférence afin d'étudier le rôle de différents chaperons d'histones H3 dans la mise en place *de novo* de variants H3.3 aux sites de dommages. Ni CAF-1, ni ASF1, ni DAXX n'est impliqué dans cette mise en place dans les cellules U2OS. Par contre, j'ai démontré que **chacune des sous-unités du complexe HIRA favorise l'accumulation de nouvelles histones H3.3** dans les régions de chromatine endommagées aux UVC (**Figures 3 & S4**). Les cellules transfectées avec un siHIRA sont celles qui présentent le défaut le plus manifeste, sûrement à cause du fait que la protéine HIRA contrôle la stabilité des autres membres du complexe (Ray-Gallet et al., 2011). La protéine HIRA semble aussi réguler indirectement la mise en place de nouveaux variants réplicatifs H3.1 aux sites de dommages induits par les UVC, mais le mécanisme sous-jacent reste à être déterminer (**Figure S4**).

Je me suis finalement intéressée au mécanisme de recrutement de HIRA dans la chromatine lésée. D'une part, ce recrutement n'est pas altéré dans les cellules U2OS préalablement traitées avec un inhibiteur de transcription (**Figure S2**). D'autre part, le **recrutement de HIRA est précoce**, observable dans les minutes qui suivent une irradiation locale aux UVC **et transitoire**, puisque plus aucune accumulation de ce chaperon d'histone n'est visualisable 5 h après irradiation (**Figure 5**). En outre, il précède l'enrichissement du chaperon d'histone CAF-1 aux sites de lésions. Ces différences de cinétiques de relocalisation traduisent une dépendance différente vis à vis de la voie de réparation NER : alors que la mise en place de nouvelles histones H3.1 par CAF-1 dans la chromatine endommagée est couplée aux étapes tardives de la réparation (synthèse réplivative, (Polo et al., 2006)), celle de **nouvelles histones H3.3 par HIRA n'est pas perturbée en absence de synthèse réparatrice mais dépend de l'activité d'ubiquitylation du complexe UV-DDB, complexe de détection des lésions induites par les UVC**. En effet, l'accumulation de HIRA et/ou de

nouvelles histones H3.3 dans les régions de chromatine lésées est fortement altérée après baisse d'expression des protéines précoces du NER, DDB1, DDB2 et CUL4A dans les cellules U2OS, sans défaut détectable de l'incorporation basale de nouvelles histones H3.3 (**Figures 4 & S5**, données non montrées). En outre, l'enrichissement de HIRA aux sites de lésions de l'ADN induites par les UVC n'est pas modifié après baisse d'expression des facteurs TC-NER CSA et CSB (données non montrées) et par perte du facteur tardif de réparation XPG (**Figure 4**). De plus, la mise en place de nouvelles H3.3 par HIRA est inhibée après perturbation globale des activités d'ubiquitylation (traitement avec un set de siARN contre l'ubiquitine ou par inhibition du protéasome) (**Figures 4 & S6**). Enfin, l'expression d'une forme dominante négative de CUL4A, capable d'être recrutée aux sites de dommages de l'ADN mais ayant perdu sa capacité de fixer la protéine E2 ubiquitine ligase, inhibe l'enrichissement de HIRA dans la chromatine endommagée (**Figure 4**). Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que c'est l'activité du complexe DDB1-CUL4A, plutôt que sa présence, qui est requise pour favoriser le recrutement de HIRA aux sites de lésions de l'ADN générées par les UVC.

En conclusion, les données obtenues ont permis de mettre en évidence **une nouvelle voie participant à la restitution de la chromatine après stress génotoxique, avec le chaperon HIRA comme facteur clé de la mise en place *de novo* de variants H3.3 dans la chromatine endommagée**. Elles révèlent en outre que mettre en place des histones néo-synthétisées aux sites de lésions de l'ADN ne nécessite pas forcément que la réparation de ces lésions soit achevée.

1.3. Discussion : comment HIRA est-il recruté aux sites de dommages ?

Le mécanisme contrôlant le recrutement du complexe HIRA aux sites de dommages générés par les UVC n'a pas encore été complètement élucidé. Le facteur de réparation UV-DDB ubiquityle divers substrats en réponse à une irradiation aux UVC, notamment les protéines de la voie NER et les histones (cf. introduction parties 1.2.2 & 3.2.1 et revue (Nospikel, 2011)). Ainsi, il est possible que ce facteur ubiquityle également le complexe chaperon HIRA, ce qui faciliterait sa redistribution aux sites de lésions de l'ADN. Une analyse à haut débit dans des cellules U2OS n'a néanmoins pas permis d'identifier de changements du niveau d'ubiquitylation des sous-unités du complexe HIRA dans les cellules humaines irradiées aux UVC (Povlsen et al., 2012). Par contre, une étude plus récente a révélé que UV-DDB interagit avec CABIN1, et faciliterait la dégradation de ce membre du complexe HIRA dans les heures qui suivent l'irradiation (Choi et al., 2013). Cependant, nous avons observé que baisser l'expression de CABIN1 par siARN défavorise le recrutement de la sous-unité HIRA aux sites de dommages (**Figures S2 & S4**), ce qui suggère que la poly-ubiquitylation et dégradation de CABIN1 dépendante du complexe UV-DDB serait plutôt

requis pour décrocher HIRA de la chromatine lésée. La possibilité que le complexe HIRA reconnaisse un ou plusieurs facteurs ubiquitylés par UV-DDB aux sites de lésions de l'ADN représente une autre hypothèse qui serait intéressante d'explorer dans de futures recherches.

Enfin, il est aussi fort probable que l'activité du complexe UV-DDB, qui semble être requis pour augmenter l'accessibilité de l'ADN dans les régions de chromatine endommagée (Nospikel, 2011), permettrait d'exposer de l'ADN nu, substrat reconnaissable par HIRA. En effet, des travaux sur des cellules humaines et chez la drosophile ont démontré que ce chaperon d'histone a la capacité de fixer directement l'ADN (Ray-Gallet et al., 2011) et se retrouve enrichi dans les régions du génome à faible densité de nucléosomes (Ray-Gallet et al., 2011; Schneiderman et al., 2012). De plus, nous avons démontré que la terminaison de la réparation et la mise en place de nouvelles histones H3.3 favorise la dissociation de HIRA de la chromatine endommagée (**Figure S5**). Donc, ces résultats suggèrent que **le complexe chaperon HIRA est recruté aux sites de lésions par l'ADN lésé, dont la densité en nucléosomes a été réduite** (modèle en **Figure 6**).

2. Importance de la voie HIRA pour la reprise de la transcription après réparation des dommages générés par les UVC

Article scientifique :

Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA.

Le processus de reprise de la transcription après dommages de l'ADN nécessite un système de marquage de la chromatine dépendant du chaperon HIRA, chaperon d'histone dédié à H3.3.

Salomé Adam, Sophie E. Polo, Geneviève Almouzni

Cell, 155 : 94-106, 2013

2.1. Réparation des dommages induits par les UVC en l'absence de HIRA

J'ai ensuite cherché à déterminer l'importance fonctionnelle de la voie HIRA dans la chromatine endommagée aux UVC. Diverses études ont révélé que le chaperon HIRA et/ou l'histone H3.3 sont requis pour la stabilité du génome chez la levure (Anderson et al., 2009; Blackwell et al., 2004; Kanoh and Russell, 2000), dans les cellules de poulet (Frey et al., 2014), et dans les cellules humaines (Pfister et al., 2014; Yang et al., 2013). Donc, j'ai testé si diminuer l'expression de la protéine HIRA par ARN interférence dans les cellules humaines U2OS et HeLa induisait des défauts de réparation par NER des dommages de l'ADN induits par les UVC. Par test clonogénique, nous n'avons pas observé d'hypersensibilité aux UVC des cellules transfectées avec un siHIRA, contrairement à celles traitées avec un siCSB (cellules déficientes dans le TC-NER) (**Figure S1**).

Afin de confirmer ce résultat, nous avons ensuite élaboré trois approches complémentaires. Dans un premier temps, j'ai analysé par immunofluorescence la cinétique de disparition des dimères de pyrimidine CPD, l'un des dommages de l'ADN majoritairement produits après irradiation globale aux UVC, dont l'élimination dans le génome est très lente (Ehmann et al., 1978). Dans un second temps, j'ai étudié le recrutement du facteur de réparation XPB dans la chromatine endommagée 30 minutes après irradiation locale aux UVC. Enfin, j'ai mesuré la synthèse réparatrice par incorporation d'ethynyl 2' deoxyuridine (EdU) aux sites de lésions 4 h après irradiation locale aux UVC (Nakazawa et al., 2010). Par ces trois approches, **aucun défaut notable de réparation des dommages induits par les UVC n'a été détecté dans les cellules traitées avec un siHIRA (Figure 2)**, confirmant ainsi les résultats du test clonogénique d'hypersensibilité aux UVC. La protéine HIRA ne semble

pas non plus impliqué dans la régulation du cycle cellulaire après lésions de l'ADN par les rayons UVC (**Figure S1**).

2.2. Marquage par HIRA de la chromatine endommagée qui la rend apte à reprendre la transcription

Vu les liens existants entre l'incorporation d'histones H3.3 par le complexe HIRA et la transcription (cf. introduction parties 2.3.2 & 2.3.3), j'ai décidé de déterminer le rôle de ce chaperon d'histones dans la régulation de la transcription après dommages de l'ADN dans les cellules humaines. Pour cela, j'ai combiné une approche d'ARN interférence avec une analyse quantitative de la transcription, par suivi de l'incorporation d'ethynyl-uridine (EU) dans les ARN naissants après irradiation aux UVC (Nakazawa et al., 2010). J'ai ainsi démontré que la **protéine HIRA n'est pas requise pour l'arrêt de la transcription post irradiation globale aux UVC mais qu'elle est nécessaire pour le redémarrage de l'activité transcriptionnelle** dans les cellules U2OS et HeLa (**Figures 1 & S1**). Par contre, cette capacité n'est pas généralisable à l'ensemble des chaperons de l'histone H3 puisque le chaperon spécifique de H3.1, CAF-1, ne semble impliqué ni dans l'arrêt ni dans la reprise de l'expression globale des gènes (**Figure 1**). En outre, le défaut de reprise de transcription observé après diminution d'expression du chaperon HIRA n'est pas lié à une perte de fonction significative de la machinerie de transcription, puisque le niveau protéique et l'état de phosphorylation de la grande sous-unité l'ARNPII semblent revenir à la normale 24 h après irradiation globale aux UVC dans les cellules transfectées avec un siHIRA (**Figure S1**). La capacité de la protéine HIRA à promouvoir le redémarrage de l'expression génique après lésions de l'ADN ne correspond pas non plus à une réponse générale à tout type de perturbation de la transcription, car baisser l'expression de HIRA par ARN interférence n'altère pas la reprise de production d'ARN après traitement des cellules avec le DRB, un inhibiteur réversible de la transcription (Bensaude, 2011) (**Figure S1**).

Enfin, nous avons comparé en détails les cinétiques de régulation de l'activité transcriptionnelle et de mise en place *de novo* d'histones H3.3 par le chaperon HIRA dans les régions de chromatine endommagées aux UVC. D'une part, nous avons observé que l'accumulation de nouveaux variants H3.3 reste visible jusqu'à au moins 24 h après irradiation locale aux UVC, alors que le recrutement de HIRA est transitoire, devenant indétectable 5 h après irradiation (**Figure 5**). Ces résultats démontrent que les histones H3.3 néo-synthétisées s'associent de manière stable avec l'ADN après incorporation par le chaperon HIRA. D'autre part, nous avons remarqué un délai de plusieurs heures entre le départ de HIRA des sites de dommages et la reprise de la transcription. Ceci laisse donc présager que **HIRA est nécessaire et mais pas suffisant pour permettre la réactivation de l'expression génique**. En fait, cette réactivation nécessite une réparation efficace des

dommages, les cellules déficientes pour le facteur NER tardif XPG étant incapables de redémarrer leur activité transcriptionnelle après irradiation aux UVC (**Figure S1**).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'un **système de marquage de la chromatine dépendant du chaperon d'histone HIRA**, qui intervient de manière très précoce en réponse aux lésions de l'ADN et **qui rend apte la chromatine à reprendre son activité de transcription une fois que les dommages sont majoritairement éliminés**.

2.3. Discussion : quelle est l'importance fonctionnelle de HIRA en réponse aux dommages de l'ADN ?

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le chaperon HIRA, qui assure l'incorporation locale de nouvelles histones H3.3 après lésions de l'ADN générées par les rayons UVC, contribue au maintien de l'intégrité structurale et transcriptionnelle de la chromatine endommagée. Nos observations indiquent de plus que la mise en place de variants H3.3 par HIRA n'est pas requise pour la réparation des dommages UVC dans les cellules humaines, même lorsque la voie CAF-1 est inactivée (résultats non montrés). Nos données sont donc en apparente contradiction avec des analyses chez la levure et dans les cellules de poulet, dans lesquelles la perte d'expression de l'histone H3.3 chez le poulet (Frey et al., 2014), et d'une des protéines orthologues de HIRA chez la levure *S. pombe* (Blackwell et al., 2004; Kanoh and Russell, 2000), conduit à une hypersensibilité à une irradiation aux UVC. Ainsi, le rôle de HIRA et de H3.3 dans le maintien de l'intégrité du génome pourrait ne pas être strictement conservé au cours de l'évolution. De plus, cette contribution est susceptible d'être plus ou moins marquée en fonction du type de dommages de l'ADN que subissent les cellules. En effet, des données récentes ont révélé que le chaperon d'histone HIRA assure également l'incorporation d'histones H3.3 aux sites de cassures double brin de l'ADN (Yang et al., 2013), et que HIRA (Adamson et al., 2012; Yang et al., 2013) et la méthylation de H3.3K36 (Pfister et al., 2014) faciliteraient la réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue dans les cellules humaines. Néanmoins, des recherches complémentaires sont nécessaires afin de déterminer si la capacité de HIRA à orienter le choix de la voie de réparation des cassures double brin est en lien direct avec la dynamique des histones H3.3 aux sites de lésions de l'ADN.

En parallèle, il serait intéressant de déterminer comment le chaperon d'histones HIRA, qui est recruté aux sites de lésions de l'ADN induites par les UVC de manière précoce et transitoire, facilite la reprise de la transcription après réparation des dommages. Même si nous n'avons pas observé de défaut majeur de réparation des lésions, avec nos données actuelles, nous ne pouvons pas formellement exclure un rôle potentiel de HIRA dans la réparation des

dommages couplée à la transcription (TC-NER). Cependant, nous n'avons pas observé d'hyper-sensibilité aux UVC des cellules dont l'expression de HIRA a été diminuée par transfection transitoire de siARN contre ce chaperon d'histones, contrairement aux cellules présentant un défaut de la voie TC-NER (cellules traitées avec siCSB, **Figure S1**). Pour confirmer ces données, il serait judicieux d'analyser directement la réparation des lésions UVC par TC-NER, par exemple en mesurant la synthèse réparatrice de cellules déficientes dans la voie GG-NER et transfectées avec un siHIRA après irradiation aux UVC (cf. méthode utilisée dans (Mourgues et al., 2013)).

Etant donnée l'importance de la mise en place de H3.3 par HIRA dans le maintien des profils d'expression génique *in vivo*, comme cela a été démontré dans différents systèmes vertébrés (cf. introduction, partie 2.3.3), il est tentant d'imaginer que les **nouvelles histones H3.3 représentent la marque laissée par HIRA sur la chromatine endommagée**, qui faciliterait la reprise de la transcription associée à la réparation des lésions induites par les UVC. Cependant, il est aussi important de prendre en compte que HIRA est susceptible de posséder un rôle plus général dans le maintien de l'intégrité de la chromatine, soit directement en étant impliqué dans la dynamique des histones H3.3 parentales (voir ci-dessous), soit indirectement en contrôlant l'incorporation de nouvelles histones H3.1 dans les régions de chromatine endommagées aux UVC (**Figure S4**). En outre, même si HIRA est le chaperon d'histones assurant la mise en place *de novo* de variants H3.3 dans nos modèles cellulaires, il est possible que d'autres chaperons spécifiques de H3.3 participent au redémarrage de la transcription après réparation des lésions de l'ADN dans d'autres contextes cellulaires. Ainsi, dans les neurones, la contribution de DAXX serait intéressante à déterminer, vu le lien établi entre l'incorporation de H3.3 par DAXX et l'expression des gènes associés à l'activation neuronale (Michod et al., 2012).

Enfin, nous avons mesuré ici de manière globale l'activité transcriptionnelle de cellules humaines après irradiation aux UVC. Cette étude pourrait être affinée par séquençage à haut débit des ARN naissants à différents points de temps après induction de dommages de l'ADN (Andrade-Lima et al., 2015). Une analyse comparée des résultats entre cellules contrôles et cellules déficientes pour HIRA permettrait de clarifier la fonction de ce chaperon de l'histone H3.3 en réponse à un stress génotoxique : assure-t-il uniquement la reprise de l'expression de gènes dont l'expression a été diminuée par la présence de lésions de l'ADN ? Ou est-il également impliqué dans l'induction des gènes de stress par les dommages de l'ADN, comme ce qui a été observé après choc thermique chez la levure *S. pombe* (Chujo et al., 2012) ?

En résumé, nous avons démontré que des histones nouvellement synthétisées sont mises en place dans la chromatine endommagée de manière couplée à la réparation de l'ADN,

ce qui permet de restituer l'architecture chromatinienne et vraisemblablement de réactiver l'expression génique. Ces histones ne sont pas nécessairement en tous points identiques aux anciennes, en particulier en ce qui concerne leurs modifications post-traductionnelles (Loyola et al., 2006), ce qui pose le défi du maintien de l'information épigénétique au cours de la restitution de la structure en chromatine. C'est une question d'autant plus pertinente qu'actuellement la dynamique des histones parentales après stress génotoxique est largement inconnue.

Transcription Recovery after DNA Damage Requires Chromatin Priming by the H3.3 Histone Chaperone HIRA

Salomé Adam,^{1,2} Sophie E. Polo,^{1,2,3,*} and Geneviève Almouzni^{1,2,*}

¹Chromatin Dynamics, Institut Curie Research Centre, 75248 Paris Cedex 5, France

²Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 218, 75248 Paris Cedex 5, France

³Present address: Epigenetics and Cell Fate Centre, UMR7216 CNRS/Université Paris Diderot, 75205 Paris Cedex 13, France

*Correspondence: sophie.polo@univ-paris-diderot.fr (S.E.P.), genevieve.almouzni@curie.fr (G.A.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.029>

SUMMARY

Understanding how to recover fully functional and transcriptionally active chromatin when its integrity has been challenged by genotoxic stress is a critical issue. Here, by investigating how chromatin dynamics regulate transcriptional activity in response to DNA damage in human cells, we identify a pathway involving the histone chaperone histone regulator A (HIRA) to promote transcription restart after UVC damage. Our mechanistic studies reveal that HIRA accumulates at sites of UVC irradiation upon detection of DNA damage prior to repair and deposits newly synthesized H3.3 histones. This local action of HIRA depends on ubiquitylation events associated with damage recognition. Furthermore, we demonstrate that the early and transient function of HIRA in response to DNA damage primes chromatin for later reactivation of transcription. We propose that HIRA-dependent histone deposition serves as a chromatin bookmarking system to facilitate transcription recovery after genotoxic stress.

INTRODUCTION

To prevent the deleterious effects of DNA lesions that constantly challenge genome integrity (Hoeijmakers, 2009), cells have developed mechanisms—collectively referred to as the DNA damage response (DDR)—to signal and repair DNA damage (Ciccia and Elledge, 2010; Giglia-Mari et al., 2011; Jackson and Bartek, 2009). Beyond genome stability, the maintenance of a defined organization of the genome into chromatin, with specific patterns of histone variants and their marks (Talbert and Henikoff, 2010), is critical for preserving genome functions and cell identity. Concerning histone H3 variants, as described in mammals, the replicative variant H3.1 is incorporated into chromatin genome-wide in a manner coupled to DNA synthesis during replication and repair. In contrast, the replacement variant H3, while present at telomeric and pericentric heterochromatin, has been strongly associated with actively transcribed genes

(Filipescu et al., 2013). However, whether H3.3 deposition drives or simply reflects transcriptional activity is still under debate. Recent data support the idea that chromatin marking by H3.3 incorporation is required for either the activation or the long-term maintenance of gene expression patterns (reviewed in Skene and Henikoff, 2013; Szenker et al., 2011), illustrating the importance of chromatin integrity in cell fate determination.

DNA damage challenges chromatin integrity by eliciting the destabilization of chromatin structure, followed by restoration of its organization (reviewed in Adam and Polo, 2012; Smerdon, 1991; Soria et al., 2012). In addition, in response to various types of DNA lesions, a local inhibition of transcription ensues, as best characterized for RNA polymerase II (RNAPII)-dependent transcription (Chou et al., 2010; Iacovoni et al., 2010; Moné et al., 2001; Pankotai et al., 2012; Shanbhag et al., 2010; Tornaletti, 2009). Such DNA damage-induced transcription arrest is critical to prevent the production of aberrant transcripts and to avoid interference between transcription and repair machineries (Svejstrup, 2010). Much effort has been devoted to understanding how transcription inhibition is achieved, particularly in response to bulky DNA lesions, which result in RNAPII stalling, followed by DNA damage bypass, RNAPII backtracking, or RNAPII removal by proteasomal degradation (Hanawalt and Spivak, 2008; Tornaletti, 2009). Displacement of stalled RNAPII allows completion of DNA repair and subsequent restart of transcriptional activity in regions that have been silenced in response to DNA damage (Gaillard and Aguilera, 2013). However, what triggers and controls transcription restart once repair is complete is still an open issue. Given the involvement of chromatin marks in regulating gene expression and integrating damage signals (Li et al., 2007; Luijsterburg and van Attikum, 2011), it is tempting to hypothesize that mechanisms involving chromatin marking could contribute to transcription recovery upon DNA damage.

Significant progress has been made in characterizing key players in chromatin dynamics that respond to DNA damage (reviewed in Soria et al., 2012). Among them, histone chaperones, which escort histones upon their synthesis up to their deposition on to DNA (Burgess and Zhang, 2013; De Koning et al., 2007), are of particular interest. Several of these chaperones have been involved in the DDR (reviewed in Avvakumov et al., 2011; Soria et al., 2012), including the H3 variant-specific chaperones

chromatin assembly factor 1 (CAF-1) and histone regulator A (HIRA). Although recent data support a possible role for HIRA in maintaining genome stability in yeast and human cells (Anderson et al., 2009; Kapitzky et al., 2010; Yang et al., 2013), the actual function of HIRA in the DDR is still elusive. Indeed, HIRA is primarily characterized as a chaperone mediating the deposition of H3.3 histone variants in transcribed chromatin regions (reviewed in Skene and Henikoff, 2013; Szenker et al., 2011). By contrast, CAF-1-mediated histone deposition is known to be coupled to repair synthesis in response to DNA damage (Gaillard et al., 1996). By means of its local recruitment to damaged chromatin regions where it promotes the incorporation of newly synthesized H3.1 histones, CAF-1 contributes to preserving chromatin organization during late repair steps in human cells (Green and Almouzni, 2003; Polo et al., 2006).

However, besides restoration of chromatin organization, whether and how chromatin dynamics could link with the recovery of transcriptional activity in damaged regions is a critical but underappreciated question. Here, we explore the regulatory mechanisms of transcription recovery after DNA damage by investigating how histone chaperones control transcription restart in response to genotoxic stress. Our findings identify a role of the H3.3 histone chaperone HIRA in priming damaged chromatin early after damage recognition, which is key to facilitating later reactivation of transcription once repair is complete.

RESULTS

Transcription Recovery after DNA Repair Involves the Histone Chaperone HIRA

In order to address whether transcription regulation may be connected to chromatin dynamics in response to DNA damage (Figure 1A), we quantified nascent transcripts by 5-ethynyl uridine (EU) labeling after global UV type C (UVC) irradiation in cells depleted of candidate histone chaperones (Figure 1B). Our detailed kinetic analysis of nascent transcript production after UVC irradiation revealed that transcription inhibition and recovery were best achieved at 2 hr and 24 hr postirradiation, respectively (data not shown), which is consistent with previous reports (Jensen and Mullenders, 2010; Nakazawa et al., 2010; Zhang et al., 2012). We thus selected these time points for subsequent analyses. The histone chaperone CAF-1, previously shown to be involved in the cellular response to UVC irradiation (reviewed in Adam and Polo, 2012), did not affect transcription arrest and subsequent recovery after DNA damage as shown by depleting its p60 subunit (Figure 1C; Table S1 [for small interfering RNAs, siRNAs] and Table S2 [for antibodies]). Strikingly, HIRA downregulation, while leaving transcription arrest unaffected, significantly impaired transcription recovery to an extent comparable to that observed in repair-deficient cells (excision-repair cross-complementing 6; siERCC6) (Figure 1C; Figure S1A available online; note that knockdown efficiencies are comparable throughout the experiment). We verified that the inhibitory effect of depleting HIRA on transcription recovery could not be explained by significant alterations in cell cycle progression (Figure S1B). Similar results obtained in U2OS cells (Figure S1D) further indicate that our findings are not limited to a particular cell line. In addition, the defect in transcription restart observed

upon HIRA knockdown cannot be due to a general loss of function of the transcription machinery, as attested by the levels and phosphorylation status of RNAPII large subunit, which return to normal 24 hr post-UVC irradiation in HIRA-depleted cells (Figure S1E).

Considering that these results may reflect a general role of HIRA associated to any disruption of transcription independent of DNA damage, we examined the effect of HIRA depletion on transcription in undamaged cells treated with 5,6-dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside (DRB), a reversible transcription inhibitor (Bensaude, 2011). Remarkably, in this setting, HIRA downregulation did not affect transcription recovery (Figure S1F). Thus, the capacity of HIRA to promote transcription restart after DNA damage is not a general response to transcription inhibition, and it may reflect a direct role of HIRA in UVC damage repair. To address this possibility, we first tested the ability of HIRA-depleted cells to survive UVC damage by performing clonogenic assays. Thus, we demonstrated that HIRA knockdown did not sensitize cells to UVC damage (Figure S1G). We then examined more specifically the repair capacity of HIRA-depleted cells by measuring the removal kinetics of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), the major UVC-induced DNA photo-products (Figure 2A). These photolesions are known to be excised with slow kinetics (Ehmann et al., 1978); therefore, we focused our analysis on late time points after UVC (24–34 hr). Consistent with the fact that HIRA-depleted cells are not hypersensitive to UVC damage, we found that these cells did not display any significant delay in UVC damage removal when exposed to global irradiation (Figure 2A). In line with these findings, the recruitment of the nucleotide excision repair factor Xeroderma Pigmentosum, complementation group B (XPB) to sites of local UVC irradiation was not affected by HIRA depletion, and DNA repair synthesis revealed by 5-ethynyl 2'-deoxyuridine (EdU) incorporation was similar to control (Figure 2B). Thus, these results show that HIRA-depleted cells do not display overall defects in UV damage repair. Similar results were obtained upon CAF-1 and HIRA codepletion (data not shown), thus discarding the hypothesis of a functional redundancy between CAF-1 and HIRA in UVC damage repair. Collectively, our data demonstrate that the histone chaperone HIRA plays a critical role in transcription recovery upon UVC damage and does so without significantly affecting the repair process per se.

HIRA Accumulation in Damaged Chromatin Regions

To determine whether HIRA contribution to transcription recovery after UVC irradiation involves a local action of this chaperone at damage sites, we investigated the recruitment of HIRA to damaged chromatin. As previously demonstrated (Green and Almouzni, 2003; Polo et al., 2006), CAF-1 p60 and p150 subunits accumulated in regions of local UVC irradiation (Figure 2C). Remarkably, we could detect all known subunits of the HIRA complex—HIRA, ubinuclein 1 (UBN1) and calcineurin-binding protein 1 (CABIN1) (Amin et al., 2012)—enriched in damaged chromatin regions (Figure 2C). By contrast, in our cell line model, we did not observe any detectable recruitment of other known H3 histone chaperones (Burgess and Zhang, 2013), including death-domain associated protein (DAXX), nuclear autoantigenic sperm protein (NASP), and antisilencing function 1 (ASF1)

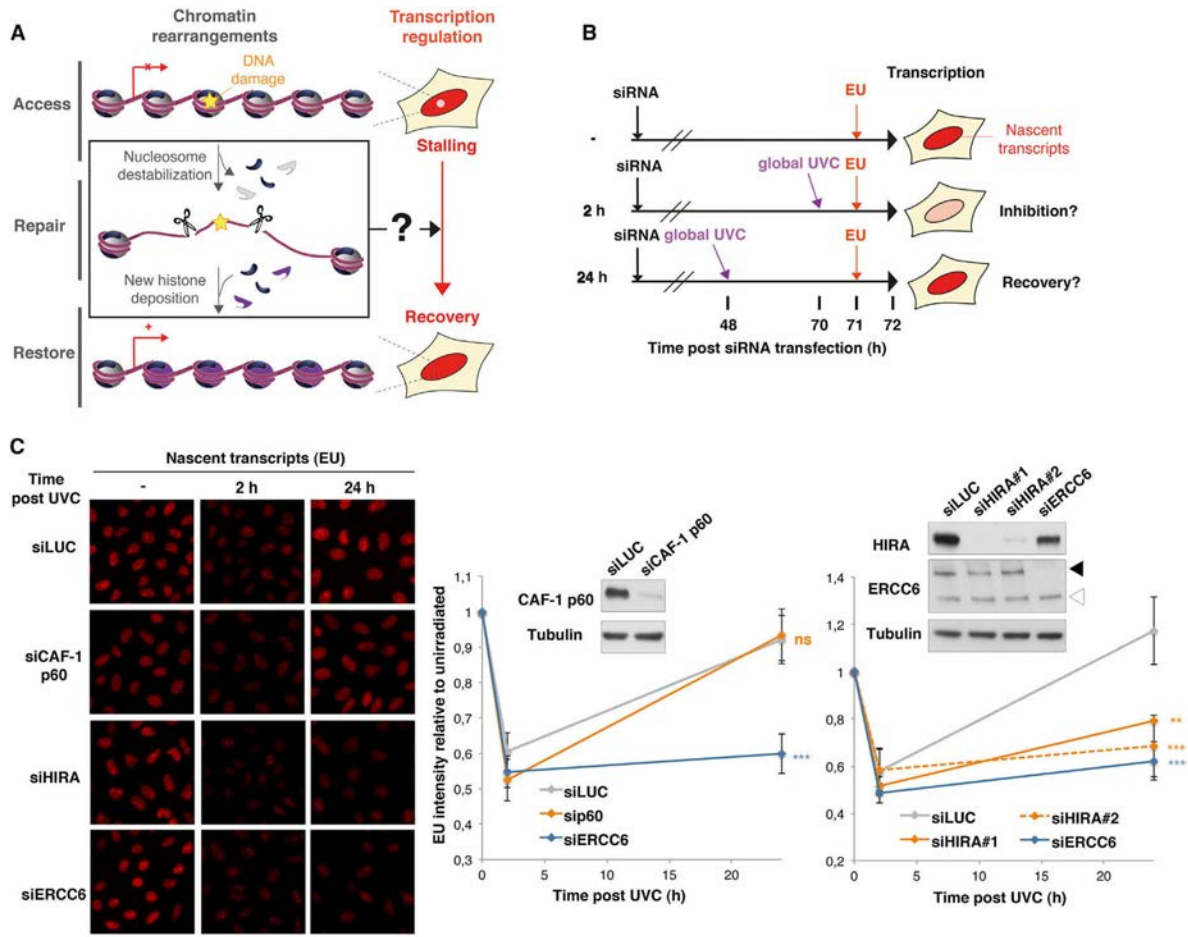


Figure 1. The Histone Chaperone HIRA Promotes Transcription Recovery after DNA Repair
 (A) Both transcription activity (red) and chromatin organization are dynamically regulated at sites of DNA damage, raising the possibility that DNA damage-induced chromatin rearrangements could be instrumental for transcription recovery after repair of DNA damage.
 (B) Scheme of the assay for monitoring transcriptional regulation in response to global UVC irradiation. EU incorporation is measured by fluorescence microscopy before (-), 2 hr after, and 24 hr after DNA damage.
 (C) Transcriptional activity in UVC-irradiated HeLa cells treated with the indicated siRNAs (siLUC, control). Error bars on the graphs represent SEM from at least two independent experiments. siRNA efficiencies are shown on the western blot panel. Black arrowhead, full-length ERCC6; white arrowhead, splice variant. Scale bar, 10 μ m. See also Figure S1.

(Figure 2C). HIRA recruitment to DNA damage was observed in the vast majority of damaged cells, both in tumoral cells and primary fibroblasts (Figure 2C; Figure S2A). It occurred regardless of cell cycle stage and in a UVC dose-dependent manner (Figures S2B and S2C). Individual depletion of HIRA complex subunits enabled us to establish that accumulation of the HIRA subunit in damaged chromatin regions occurred independently of UBN1 but was favored in the presence of CABIN1 (Figure S2D). Thus, besides the active role of UBN1 in stimulating the deposition activity of the HIRA subunit (Ray-Gallet et al., 2011), we describe a function for CABIN1 in stabilizing HIRA at sites of DNA lesions.

Taken together, these data put forward the histone chaperone complex HIRA as a UVC damage response factor that accumulates locally in DNA damaged chromatin regions.

HIRA-Mediated Accumulation of New H3.3 Histones in Damaged Chromatin Regions

Because the HIRA complex promotes de novo deposition of the H3.3 variant into chromatin (reviewed in Szenker et al., 2011), we examined new H3.3 histone deposition in damaged chromatin regions. For this, we combined local UVC irradiation with specific tracking of newly synthesized histones. We took advantage of the SNAP-tag technology to fluorescently label new histones

(Bodor et al., 2012; see [Experimental Procedures](#) for details), using U2OS cells engineered to stably express SNAP-tagged histone H3 variants (Dunleavy et al., 2011) (see [Figure 3A](#) and [Figure S3](#) for a characterization of the cell lines). Thus, we revealed a local enrichment of newly synthesized H3.3 in UVC-damaged chromatin, as observed in U2OS cells ([Figure 3B](#)), but also in HeLa cells stably expressing SNAP-tagged H3.3 (data not shown). Similar to HIRA recruitment, new H3.3 histones accumulated in UVC-damaged regions in the vast majority of damaged cells and throughout interphase ([Figures 3B](#) and [S2B](#)). Furthermore, we reproduced these findings by monitoring real-time accumulation of new H3.3 at sites of UVC laser micro-irradiation ([Figure S2F](#)). Although we also detected new H3.1 histone accumulation both at repair sites and replication foci, consistent with previous results (Polo et al., 2006; Ray-Gallet et al., 2011), we did not observe any detectable accumulation of newly synthesized CenH3, a centromeric histone variant ([Figure 3B](#)). These data highlight that not all new histone H3 variants are equally mobilized in response to DNA damage.

In order to characterize the molecular determinants of new H3.3 accumulation in UVC-damaged regions, we analyzed the effect of depleting candidate histone H3 chaperones. We observed a significant reduction of H3.3 de novo accumulation in damaged chromatin regions in cells depleted of HIRA complex subunits, with the most severe effect occurring on depletion of the HIRA subunit itself ([Figure 3C](#)), as confirmed with an independent set of siRNAs ([Figure S4A](#)). This is consistent with the central role of this protein in the overall stability of the complex, as shown by the reduced levels of the other subunits in HIRA-depleted cells ([Figure 3C](#); Ray-Gallet et al., 2011). In addition, expression of an siRNA-resistant HIRA construct restored the accumulation of new H3.3 histones in UVC-damaged chromatin regions ([Figure 3D](#)). These results establish that the defective accumulation of H3.3 in damaged chromatin is a direct and specific consequence of HIRA loss of function. We also found some defect in H3.1 deposition in damaged chromatin regions on depletion of HIRA, indicating a more general impact of this chaperone on chromatin integrity at damage sites ([Figure S4B](#)). In contrast to HIRA subunits, depletion of any of the other chaperones tested, including ASF1, CAF-1, and the H3.3-specific chaperone DAXX, did not affect new H3.3 accumulation in damaged regions ([Figure 3C](#); data not shown). We verified that the inhibitory effect of depleting HIRA complex subunits on new H3.3 accumulation could not be explained by alterations in the cell cycle profiles or marked changes in the total levels of new H3.3 ([Figure S4C](#) and [S4D](#)). It is interesting that new H3.3 accumulation in damaged chromatin remained undetectable 8 hr after local UVC irradiation in HIRA-depleted cells, indicative of an impaired rather than a delayed process ([Figure S4E](#)).

From these results, we conclude that newly synthesized H3.3 histones accumulate in damaged chromatin regions in a HIRA-dependent manner. Thus, we identify a pathway for restoring chromatin structure after genotoxic stress.

New H3.3 Accumulation on Detection of DNA Damage

Because the mechanism of HIRA recruitment to chromatin was still elusive, we wondered how HIRA could be targeted to

damaged chromatin regions to mediate H3.3 deposition and which parameters could control this key event. Given that H3.3 deposition by the HIRA complex has been linked to RNAPII (Jullien et al., 2012; Placek et al., 2009; Ray-Gallet et al., 2011; Szenker et al., 2011; 2012; Yang et al., 2011), we first tested the effect of inhibiting transcription. However, cell treatment with RNAPII inhibitors such as α -amanitin or DRB did not impair HIRA accumulation at sites of DNA damage ([Figure S2G](#)). Thus, HIRA recruitment to damaged chromatin regions is not transcription dependent, arguing that HIRA is targeted to DNA damage regardless of the transcription status of the region before damage infliction. To explore whether a more specific connection with the DDR could be involved, we depleted candidate factors of the nucleotide excision repair (NER) pathway, which removes UVC damage (reviewed in Nospikel, 2009) ([Figure 4A](#)). Although depletion of the endonuclease xeroderma pigmentosum group G (XPG) abrogated CAF-1 recruitment to UVC damage because it impaired repair synthesis (Green and Almouzni, 2003), HIRA accumulation still occurred in damaged chromatin regions ([Figure 4A](#)). These data indicate that HIRA recruitment is not coupled to late repair steps. However, depletion of early NER factors involved in the recognition of UVC damage, such as Cullin4A (CUL4A) and DNA damage binding proteins 1 and 2 (DDB1 and DDB2, respectively) (Nospikel, 2009), markedly impaired HIRA recruitment to damaged chromatin and de novo H3.3 accumulation in damaged regions without affecting HIRA total levels and H3.3 production ([Figure 4B](#); [Figure S5A](#) and [S5B](#) for a second set of siRNAs). Although HIRA targeting to DNA damage could involve an association—direct or indirect—between HIRA complex subunits and these early NER proteins, as recently reported for CABIN1 (Choi et al., 2013), it may also require the E3 ubiquitin ligase activity of DDB1-CUL4A-containing complexes (reviewed in Nospikel, 2011; [Figure S6A](#)). Consistent with this possibility, by preventing all ubiquitylation reactions using RNA interference against ubiquitin, we inhibited both HIRA and new H3.3 accumulation in UVC-damaged chromatin without any significant effect on HIRA total levels ([Figure 4C](#)). To strengthen these data, we perturbed ubiquitin-dependent signaling by proteasome inhibition ([Figure S6B](#)). This treatment depletes the cellular pool of free ubiquitin (Dantuma et al., 2006), thus preventing de novo ubiquitylation reactions taking place at damage sites ([Figure S6C](#); Mailand et al., 2007). Consistent with a major role for such ubiquitylation reactions in controlling HIRA-mediated H3.3 deposition in damaged chromatin regions, treatment of cells with proteasome inhibitors—MG132 or epoxomicin—severely impaired the accumulation of HIRA and new H3.3 at sites of UVC damage ([Figure S6B](#); and data not shown). Of note, this inhibition occurred even though CUL4A was still recruited to damaged chromatin ([Figure S6D](#); Ishii et al., 2010). Furthermore, the expression of a dominant-negative form of CUL4A, proficient for UVC damage binding and deficient for ubiquitylation, inhibited HIRA recruitment to damaged chromatin ([Figure 4D](#)). These results establish that the ubiquitylation activity of the DDB1-CUL4A complex, rather than its presence at damage sites, is critical for stimulating HIRA and new H3.3 accumulation. Remarkably, once recruited, the HIRA complex remains

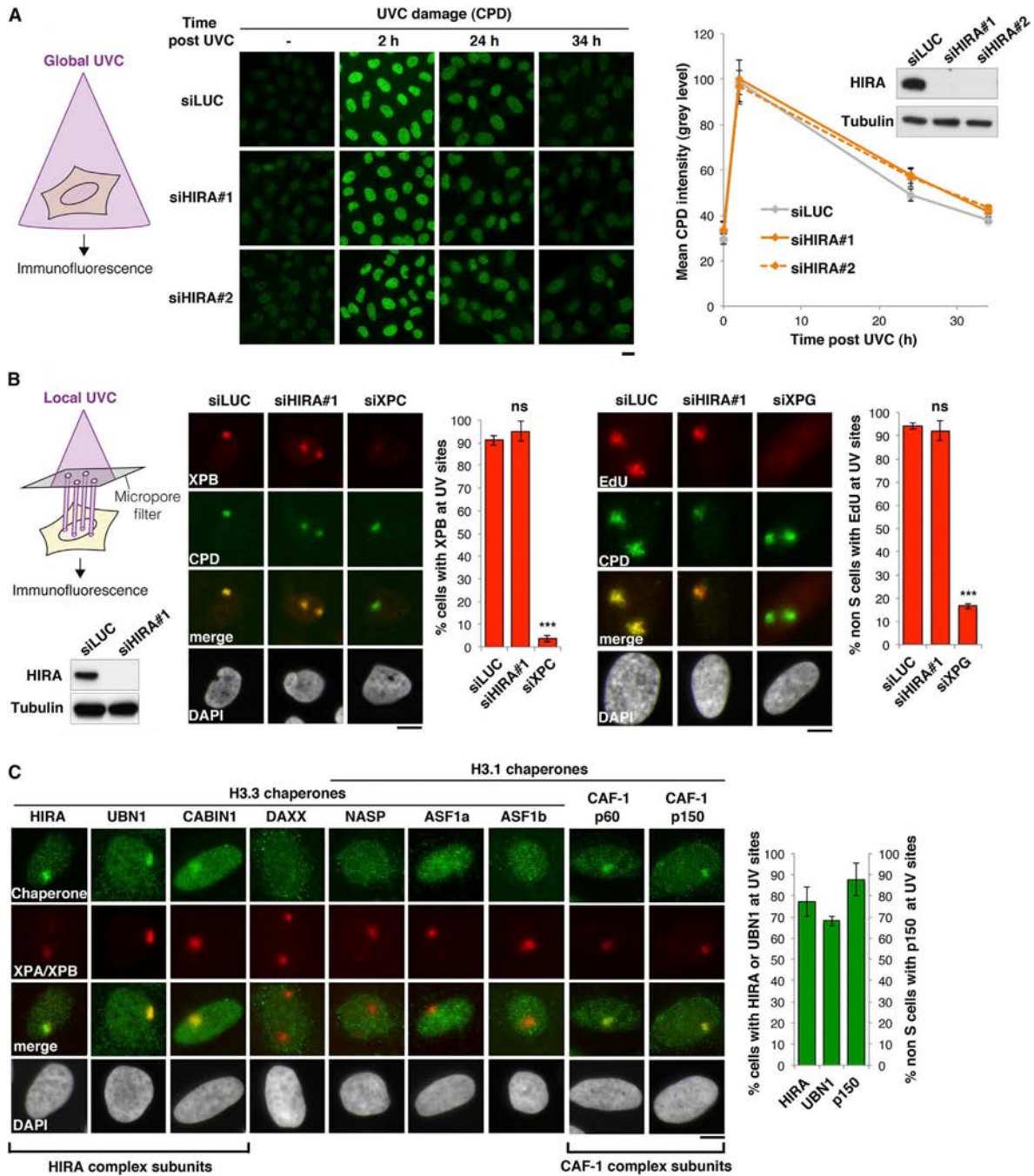


Figure 2. HIRA Function in the DNA Damage Response

(A) Repair activity analyzed by immunofluorescence against CPDs at different time points postglobal UVC irradiation (as depicted on the left) in HeLa cells treated with the indicated siRNAs (siLUC, control). siRNA efficiencies are shown on the western blot panel.

(B) Recruitment of the repair protein XPB and repair synthesis (EdU incorporation) at DNA damage (CPD) analyzed by immunofluorescence 30 min and 4 hr after local UVC irradiation, respectively, in U2OS cells treated with the indicated siRNAs. Local UVC damage is induced by irradiating cells with a UVC lamp through a

(legend continued on next page)

only transiently enriched in damaged chromatin. By exploring the molecular determinants of HIRA dissociation from damaged chromatin, we also shed light on a possible mechanism for HIRA recruitment. Indeed, we observed that HIRA release from UVC-damaged chromatin regions is impaired in repair-deficient cells (siXPG) and significantly delayed on H3.3 depletion (Figure S5C). These results show that completion of DNA repair and new histone deposition are both required to displace HIRA from damaged chromatin, suggesting that this chaperone is recruited to nucleosome-free damaged DNA.

Collectively, these data demonstrate that HIRA-mediated accumulation of new H3.3 is an early response to DNA damage, dependent on ubiquitylation events mediated by the DDB2-DDB1-CUL4A complex, an early NER factor involved in DNA damage detection. Furthermore, these findings highlight that completion of DNA repair is not a pre-requisite for new histone deposition into damaged chromatin but is critical for HIRA dissociation from UVC-damaged regions.

HIRA Priming Role for Transcription Recovery

To further explore the functional relationships between the histone chaperone HIRA and transcription regulation in response to DNA damage, we dissected the relative kinetics of HIRA accumulation and transcription recovery in damaged chromatin regions.

Consistent with its dependency on early repair steps, we detected HIRA recruitment to UVC-damaged chromatin within minutes after damage, reaching a maximum 40 min postirradiation. Furthermore, HIRA recruitment preceded the accumulation of the histone chaperone CAF-1 to DNA lesions (Figure 5A). Interestingly and consistent with a histone chaperone function, we found that HIRA targeting to damaged chromatin was transient, becoming undetectable 5 hr postdamage induction (Figures 5A and 5B). In contrast, the accumulation of new H3.3 at sites of DNA damage remained detectable up to 24 hr postirradiation (Figures 5B and 5C). Thus, we conclude that newly synthesized H3.3 histones stably associate with DNA upon deposition by the HIRA chaperone in damaged chromatin and remain in place at least until repair is complete.

Next, we compared the relative kinetics of HIRA-dependent H3.3 deposition and transcription regulation at sites of local UVC irradiation. When HIRA was enriched at DNA damage (1 hr postdamage induction), we observed a local inhibition of transcription at these locations (Figure 5C), consistent with previous observations (Moné et al., 2001). Remarkably, transcription was still inhibited 5 hr after damage, when HIRA was already released from damaged chromatin regions. It was only long after HIRA release from damaged chromatin that transcriptional activity recovered (20–24 hr; Figure 5C). Thus, although HIRA determines transcription restart after damage, its enrichment in damaged chromatin is not concomitant with transcription recovery. These results imply that HIRA is necessary, but not sufficient,

to allow reactivation of transcription. Indeed, transcription does not restart after UVC irradiation in repair-deficient XPG-depleted cells (Figure S1C), even if HIRA is efficiently recruited to damaged regions in these cells (Figure 4A). Thus, HIRA-independent DNA damage repair events occur in the meantime to allow reactivation of transcription.

Together, these data establish that HIRA acts early and transiently at sites of DNA damage, prior to repair completion and transcription recovery. Based on these findings, we propose that HIRA recruitment to damaged regions acts as a priming event making damaged chromatin prone for transcription restart once repair is complete.

DISCUSSION

Our study defines a histone deposition pathway that primes chromatin in response to DNA damage allowing transcription recovery after repair (Figure 6). This pathway involves early targeting of the histone chaperone HIRA to DNA lesions, where it promotes de novo deposition of H3.3 histones and renders chromatin prone for later reactivation of transcription. In light of these data, we propose a concept of chromatin bookmarking by histone deposition early on during the DDR that licenses the chromatin substrate for transcription.

HIRA Targeting to Damaged Chromatin and New H3.3 Deposition

Although the yeast orthologs of the HIRA complex protect cells against genotoxic agents (Anderson et al., 2009; Kapitzky et al., 2010), the actual role of this chaperone in response to DNA damage is unknown, and in other eukaryotes, the contribution of HIRA to the DDR remains elusive. Here, we characterize a transcription-associated function for HIRA in the DDR. Our observations indicate that, contrary to its yeast counterparts, human HIRA is not required for genome stability per se but instead contributes to transcription restart after repair. Furthermore, HIRA exerts a local action in damaged chromatin regions by depositing newly synthesized H3.3 histones. In this setting, HIRA recruitment is not driven by the transcriptional activity but by the presence of DNA lesions. These findings have broad implications for our understanding of H3.3 deposition that, at least in this instance, does not simply occur as a consequence of transcription. Considering that another set of new histones is deposited by CAF-1 during the late repair steps (Polo et al., 2006), the impact of newly deposited histones on the chromatin landscape at damage sites is particularly intriguing. This is a critical issue given that new soluble histones show a distinct pattern of modifications when compared to nucleosomal histones (Loyola et al., 2006). How much and for how long newly incorporated histones stay in damaged chromatin regions will thus determine the extent to which the original information conveyed by chromatin is ultimately modified, which will be the matter of future investigations.

micropore filter as shown on the scheme. siRNA efficiencies are controlled on the western blot panel. Depletion of the repair proteins XPC and XPG are used as positive controls.

(C) Recruitment of H3 histone chaperones to DNA damage analyzed by immunofluorescence 30 min after local UVC irradiation in U2OS cells. Immunodetection of the repair protein XPA or XPB labels damaged regions. Error bars on the graphs represent SD from at least two independent experiments. Scale bars, 10 μ m. See also Figure S2.

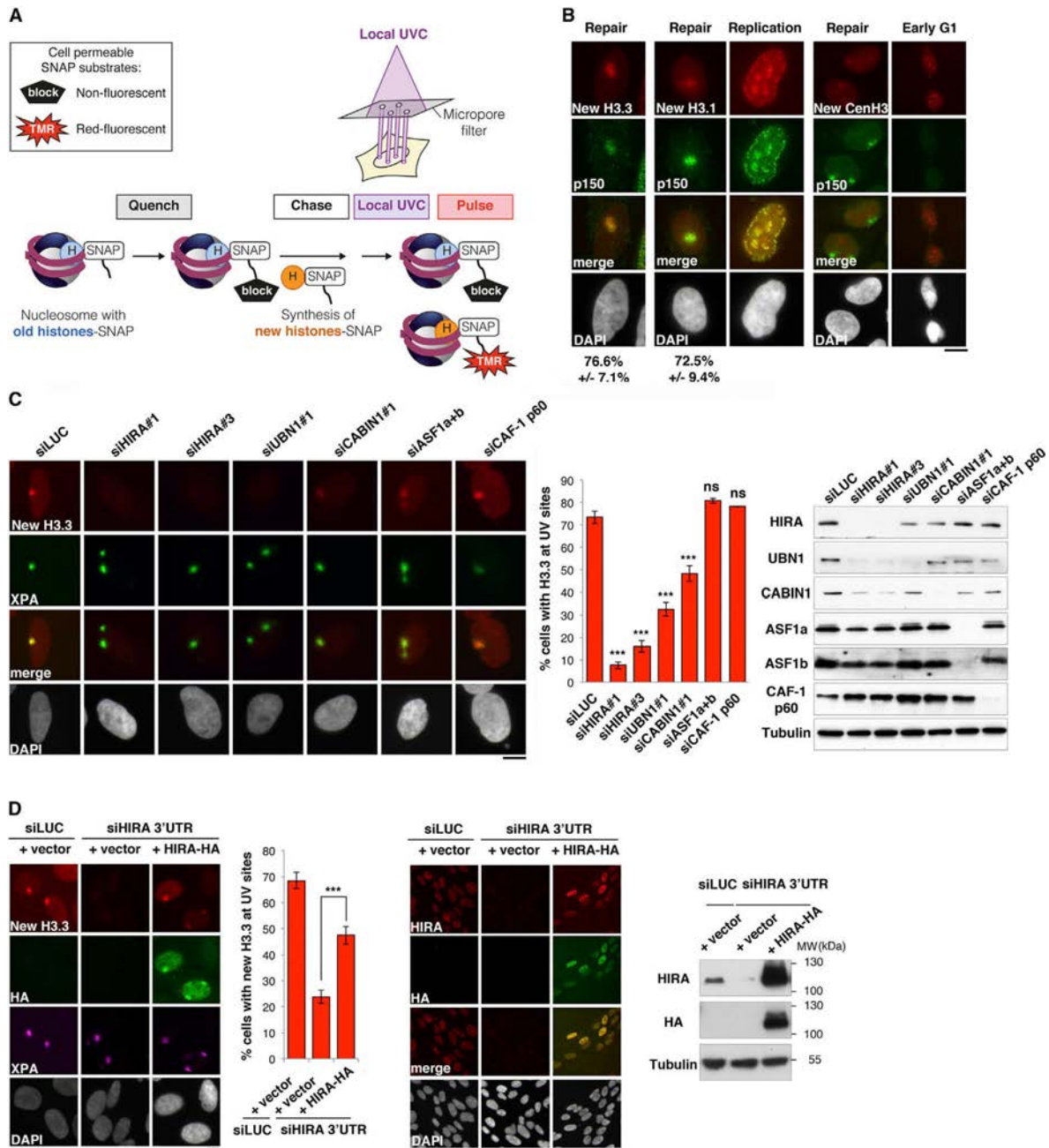


Figure 3. The HIRA Complex Promotes New H3.3 Accumulation in Damaged Chromatin Regions

(A) Scheme of the assay for monitoring accumulation of newly synthesized histones at UVC damage by fluorescence microscopy on cultured human cells stably expressing SNAP-tagged histones. Pre-existing SNAP-tagged histones are quenched with a nonfluorescent substrate (block) so that only the histones neo-synthesized during the chase period are labeled with the red fluorescent substrate tetramethylrhodamine (TMR)-star during the pulse step. Local UVC damage is induced as in Figure 2B and cells are fixed 1 hr later.

(B) Accumulation of new H3.1 and H3.3, but not CenH3 variant, in UV-damaged regions analyzed by fluorescence microscopy in U2OS cells. CAF-1 p150 subunit immunodetection labels replication and repair foci. As positive controls, we detect new H3.1 at replication foci and new CenH3 at centromeres in early G1 cells.

(legend continued on next page)

In our study, we revealed clearly distinct functions for two chromatin assemblers, HIRA and CAF-1, in response to UVC damage, as only HIRA is critical to facilitate transcription recovery after DNA repair. Another important feature that distinguishes HIRA from CAF-1 is the timing of targeting to damaged chromatin. Our mechanistic studies reveal that HIRA recruitment is a very early and transient response that depends on DNA damage detection by DDB1-CUL4A-containing complexes. These complexes promote ubiquitylation of various substrates in response to DNA damage, including NER factors and histones (Nouspikel, 2011). Ubiquitylation of the HIRA complex itself is an attractive hypothesis to explain how HIRA is recruited to damaged chromatin. However, a recent systems-wide analysis did not identify ubiquitylation changes on HIRA or its associated proteins UBN1 and CABIN1 after UVC damage in human cells (Povlsen et al., 2012). Another hypothesis that should be explored in future studies is that the HIRA complex could possibly recognize one or several of the numerous ubiquitylation targets of DDB1-CUL4A at damage sites. However, in light of recent work in human cells and flies showing that HIRA can directly bind DNA (Ray-Gallet et al., 2011) and is recruited to nucleosome-free regions (Ray-Gallet et al., 2011; Schneiderman et al., 2012), it is tempting to speculate that the ubiquitylation activity of DDB1-CUL4A-containing complexes, which is thought to increase DNA accessibility at damage sites (Nouspikel, 2011), could expose naked DNA stretches, thereby triggering HIRA recruitment. Consistent with such a model where HIRA would be recruited to histone-free DNA, we showed that histone deposition promotes HIRA displacement from UV-damaged chromatin.

In addition, HIRA function in the DDR may not be restricted to UVC photoproducts but could also be involved in response to other types of DNA lesions, including DNA breaks, as recently described (Yang et al., 2013). Indeed, in support of this broader function and consistent with a previous study (Adamson et al., 2012), we observed a transient accumulation of HIRA at sites of UVA laser microirradiation (Figure S2E). It is striking that, once recruited, the HIRA complex remains only transiently in damaged chromatin. Whether this release is itself critical for HIRA contribution to transcriptional reactivation is still to be determined. Most important, this transient presence delineates a specific time window for HIRA action that will impact transcription only after repair is complete.

HIRA Function in Transcriptional Reactivation

Recovery of transcriptional activity after DNA damage repair, although critical for cell function, has remained essentially an uncharacterized process to date. Here, we provide proof that specific chromatin dynamics directly contribute to this process, by showing that the H3.3-specific chaperone HIRA primes chromatin for later recovery of transcription following DNA damage repair. How the early and transient action of HIRA at damaged

regions actually makes damaged chromatin prone for transcription restart is intriguing. An important function of HIRA at DNA damage that we identified in our study is its ability to deposit new H3.3, which has been associated with transcriptional activation in various contexts and organisms—cross-tolerance in fission yeast, early embryonic development and nuclear reprogramming in *Xenopus*, muscle differentiation in mouse cells, and response to viral infection in human cells (Chujo et al., 2012; Julien et al., 2012; Placek et al., 2009; Szenker et al., 2012; Yang et al., 2011). Maintaining a certain level of H3.3 histones, which are prone to exclude repressive proteins and to carry specific sets of posttranslational modifications promoting transcription (reviewed in Szenker et al., 2011), could ensure that repaired chromatin remains a preferred substrate for RNA polymerase. Consistent with this model, we showed that the defect in transcription restart observed upon HIRA knockdown is not due to a loss of function of the transcription machinery. In this context, it will be interesting to explore whether mutations in H3.3 recently identified in pediatric brain tumors (Schwartzentruber et al., 2012; Sturm et al., 2012; Wu et al., 2012) could misregulate the response of HIRA to DNA damage and thereby affect the maintenance of genome function.

In addition, beyond a direct effect on H3.3 deposition, a more general role of HIRA in the maintenance of chromatin integrity, even indirectly by affecting H3.1 deposition, should also be integrated. Furthermore, while HIRA is the predominant histone chaperone mediating de novo H3.3 deposition in damaged chromatin regions in our cell line models, we cannot exclude a possible contribution of other chaperones in distinct cellular contexts such as in neurons, where DAXX-mediated H3.3 deposition controls the expression of genes responsive to neuronal activation (Michod et al., 2012).

Most important, we have identified at the level of chromatin organization a key priming event for transcription restart that occurs early in the DDR, independently of global DNA repair. While our study characterized HIRA-mediated reactivation of transcription after DNA damage on a genome-wide scale, it remains to be determined whether this mechanism applies similarly to gene-rich and noncoding regions as found in heterochromatin. More subtle effects on transcription profiles at specific genomic regions could also be encountered upon milder alterations in histone dynamics, which should be possible to detect using emerging high-throughput technologies for nascent RNA sequencing (Churchman and Weissman, 2011; Core et al., 2008).

In conclusion, we provide an understanding of transcriptional control after DNA damage involving chromatin bookmarking by histone chaperones to license repaired DNA to be transcribed. These findings open up avenues to unravel how genotoxic stress could influence transcriptional programs via seemingly minor changes in chromatin resetting and, thus, have a profound impact on cell fate.

(C and D) Accumulation of new H3.3 in UV-damaged regions requires the HIRA complex. New H3.3 accumulation at DNA damage is revealed in U2OS cells treated with the indicated siRNAs (siLUC, control) (C) or with the indicated combinations of siRNAs and plasmids (D). XPA labels repair sites, and hemagglutinin (HA) immunodetection is used to visualize exogenous HIRA. Efficiencies of siRNA and plasmid transfections are shown on the western blots and on the right immunofluorescence panel. Error bars on the graphs represent SD from three independent experiments. Scale bars, 10 μ m. See also Figures S3 and S4.

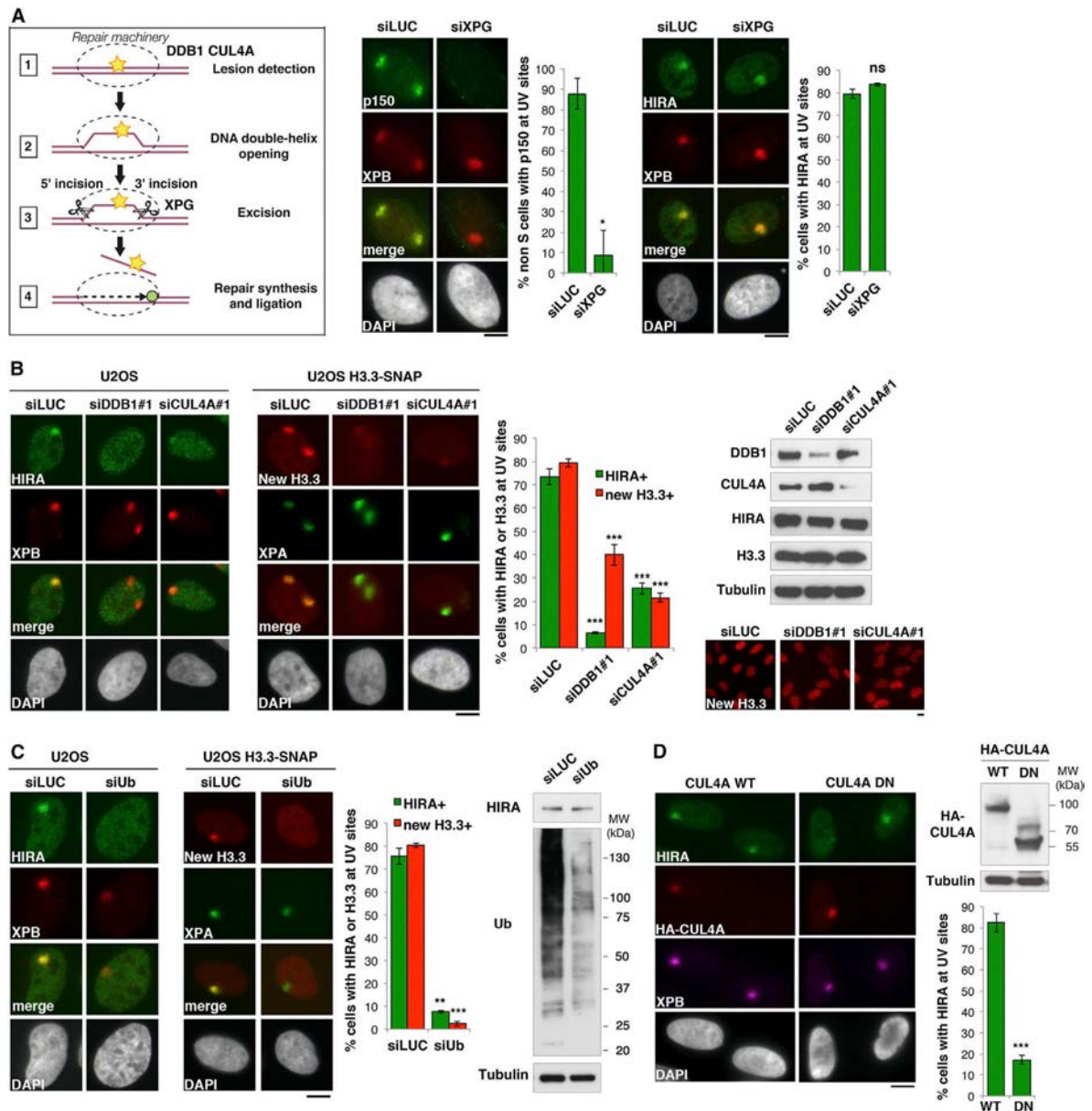


Figure 4. HIRA-Mediated H3.3 Accumulation Is an Early Response Dependent on Ubiquitylation Events upon DNA Damage Detection
 (A) Scheme indicating the early and late NER proteins targeted by RNA interference in subsequent experiments. Recruitment of HIRA and CAF-1 p150 to DNA damage regions marked by XPB is analyzed by immunofluorescence 30 min and 1 hr after local UVC irradiation, respectively, in U2OS cells treated with the indicated siRNAs (siLUC, control).
 (B) HIRA and new H3.3 accumulation in UVC-damaged regions analyzed 30 min and 1 hr postlocal UVC irradiation respectively, in U2OS cells treated with the indicated siRNAs. siRNA efficiencies, HIRA, and H3.3 total levels are shown on the western blot panel. The levels of new H3.3 incorporated into chromatin are analyzed by SNAP labeling (bottom panel).
 (C) HIRA and new H3.3 accumulation at DNA damage analyzed as in (B).
 (D) HIRA accumulation at DNA damage analyzed 30 min postlocal UVC irradiation in U2OS cells transiently transfected with the indicated plasmids. The expression of CUL4A full-length (WT) and truncated mutant (DN) is shown on the western blot panel. Error bars on the graphs represent SD from at least two independent experiments. Scale bars, 10 μ m.
 See also Figures S5 and S6.

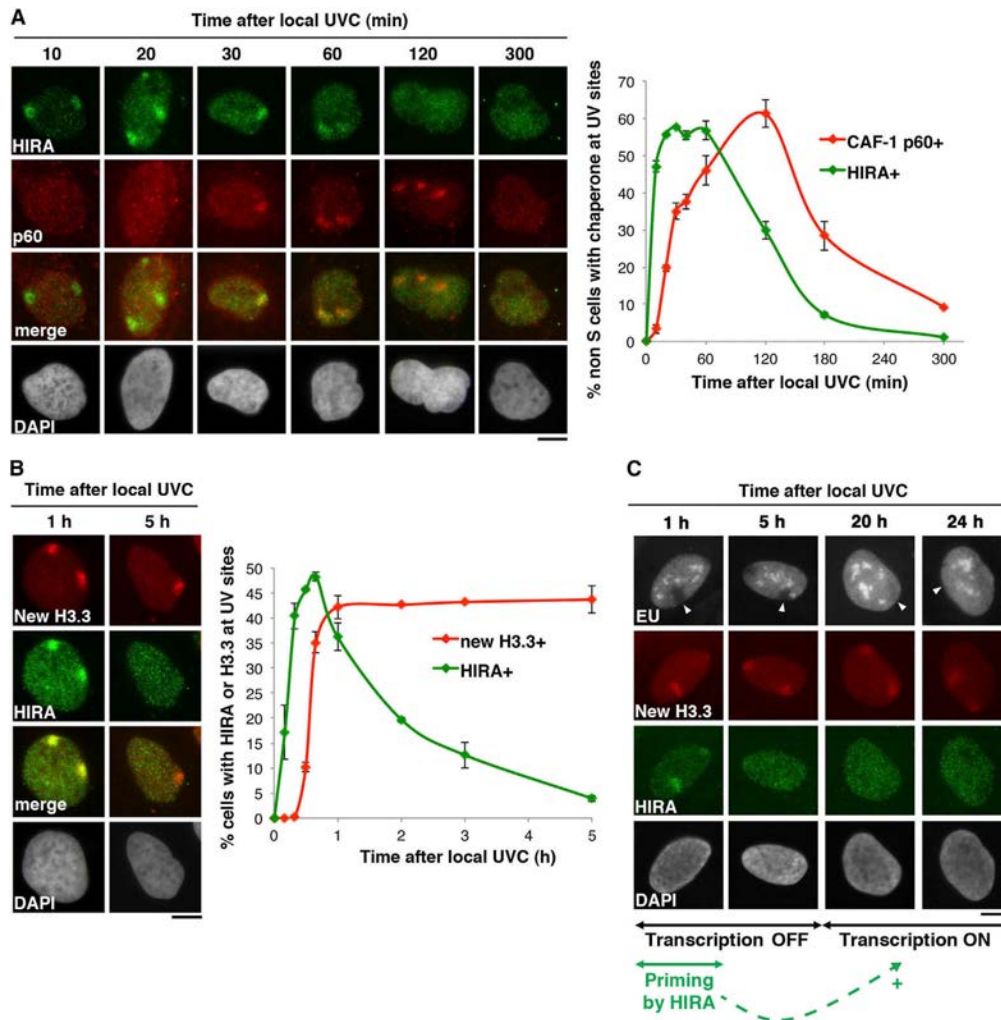


Figure 5. HIRA-Mediated H3.3 Deposition Does Not Coincide with Transcription Recovery

(A) Recruitment kinetics of HIRA and CAF-1 p60 to DNA damage analyzed by immunofluorescence at the indicated time points after local UVC irradiation in U2OS cells.

(B) Accumulation kinetics of new H3.3 and its chaperone HIRA at DNA damage monitored at the indicated time points after local UVC irradiation in U2OS cells.

(C) Nascent RNA synthesis (EU labeling) analyzed at the indicated time points after local UVC irradiation (100 J/m²) in U2OS cells in parallel with the accumulation of new H3.3 and its chaperone HIRA at DNA damage. Arrowheads point to sites of irradiation. Error bars on the graphs represent SD from three independent experiments. Scale bars, 10 μm.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Drug Treatment

HeLa and U2OS cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (EUROBIO), 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin (Invitrogen). BJ primary fibroblasts were grown in the same medium supplemented with 15% fetal calf serum and antibiotics. U2OS cells stably expressing H3.1-, H3.3-, or CenH3-SNAP (Dunleavy et al., 2011) were maintained in the presence of 100 μg/ml G418 (Invitrogen).

RNAPII-dependent transcription was inhibited by incubating cells in the presence of 100 μM DRB for 2 hr or 10 μg/ml α-amanitin for 8 hr (Sigma-

Aldrich). For proteasome inhibition, cells were treated with 10 μM MG132 (Merck) in dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 hr. DNA breaks were induced by treating cells with 50 μg/ml phleomycin (Sigma-Aldrich) for 30 min.

UV Irradiation

Cells were subjected to global or local UVC irradiation (254 nm), to laser-induced UVC damage (266 nm) and to UVA laser microirradiation (405 nm) as described in the [Extended Experimental Procedures](#).

Flow Cytometry

Cells were fixed in ice-cold 70% ethanol before DNA staining with 50 μg/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich) in PBS containing 0.05% Tween and 0.5 mg/ml

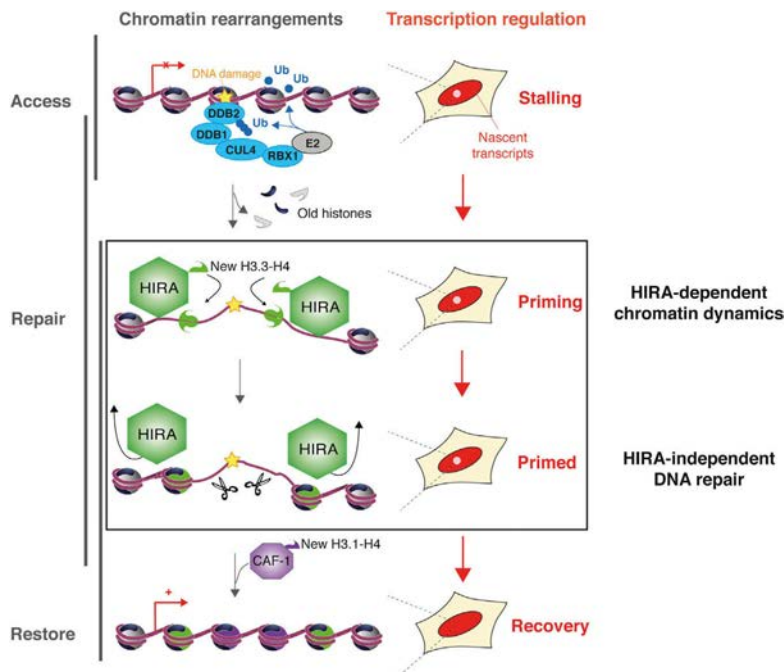


Figure 6. Model for Chromatin Bookmarking by HIRA-Dependent Histone Deposition Allowing Transcription Restart after Repair of DNA Damage

Scheme representing how H3 histone chaperones contribute to restoring nucleosomal organization in response to DNA damage. Early ubiquitylation associated with damage detection targets HIRA to damaged chromatin regions where it deposits new H3.3 histones and promotes subsequent events in chromatin dynamics, including CAF-1-mediated H3.1 deposition. Although not essential for global repair, these HIRA-dependent chromatin changes are key in restoring a proper chromatin organization and in bookmarking damaged chromatin for subsequent transcription restart (“priming” function).

Nascent RNA Labeling

Nascent RNA labeling by EU incorporation was performed with Click-IT RNA Imaging kits (Invitrogen). Refer to the [Extended Experimental Procedures](#) for details.

Visualization of DNA Repair Synthesis

EdU was incorporated into cells during 4 hr immediately after local UVC irradiation and revealed using the Click-IT EdU Alexa Fluor 594 Imaging kit (Invitrogen) according to manufacturer’s instructions before CPD labeling by immunofluorescence.

Imaging kit (Invitrogen) according to manufacturer’s instructions before CPD labeling by immunofluorescence.

SNAP Labeling of Histones

The SNAP labeling protocol is as described in [Bodor et al. \(2012\)](#). Refer to the [Extended Experimental Procedures](#) for details.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Extended Experimental Procedures, six figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.029>.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to J. Haber, M. Papamichos-Chronakis, and D. Ray-Gallet for critical reading of the manuscript and to members of UMR218 for helpful discussions. We thank E. Dunleavy and C. de Noronha for cell lines and reagents and O. Renaud, O. Leroy, and P. LeBaccon from the PICT-IBISA imaging facility. This work was supported by la Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue 2010), the European Commission Network of Excellence “Epi-GeneSys” (HEALTH-F4-2010-257082), the European Research Council Advanced Grant “Eccentric” (2009-AdG_20090506), and the French National Research Agency (Labex “DEEP”) in G.A.’s laboratory. Research in S.E.P.’s group is supported by the French National Research Agency (ANR-12-JSV6-0002-01), the “Who am I?” Laboratory of Excellence (ANR-11-LABX-0071) funded by the French Government through its “Investments for the Future” program (ANR-11-IDEX-0005-01), and the Fondation ARC. S.A. is a recipient of a PhD fellowship from University Pierre & Marie Curie, and S.E.P. is funded by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and a Marie Curie Intra-European fellowship.

Received: April 26, 2013
 Revised: July 17, 2013
 Accepted: August 16, 2013
 Published: September 26, 2013

RNase A (USB/Affymetrix). DNA content was analyzed by flow cytometry using a C6 flow cytometer (Accuri). Proportion of cells in each step of the cell cycle was estimated using the Dean/Jett/Fox algorithm on FlowJo software (TreeStar).

siRNA and Plasmid Transfection

siRNA purchased from Dharmacon or Eurofins MWG Operon ([Table S1](#)) were transfected into cells using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) following manufacturer’s instructions. The final concentration of siRNA in the culture medium was 30–50 nM. Cells were harvested 24–72 hr posttransfection.

Cells were transiently transfected with plasmid DNA (1 µg/ml final) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer’s instructions 48 hr before subsequent cell treatment. For rescue experiments, cells were concomitantly transfected with siRNA (30 nM final) and plasmid DNA (0.375 µg/ml final) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer’s instructions 72 hr before subsequent cell treatment. Plasmids are described in the [Extended Experimental Procedures](#).

Colony-Forming Assays

Cells were replated 48 hr after siRNA transfection and exposed to global UVC irradiation the following day. Colonies were stained 12 days later with 0.5% crystal violet/20% ethanol and counted. Results were normalized to plating efficiencies and analyzed by a two-way analysis of variance followed by Bonferroni posttests with Prism 5 software (ns, nonsignificant, *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001).

Cell Extracts and Western Blot

Cell extracts were obtained as described in the [Extended Experimental Procedures](#) and run on 4%–20% Mini-PROTEAN TGX gels (Bio-Rad). Proteins of interest were probed using the appropriate primary ([Table S2](#)) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch).

Immunofluorescence

Cells were subjected to immunostaining with primary ([Table S2](#)) and secondary antibodies conjugated to Alexa-Fluor 488, 594, or 680 (Invitrogen) as described in the [Extended Experimental Procedures](#).

REFERENCES

- Adam, S., and Polo, S.E. (2012). Chromatin dynamics during nucleotide excision repair: histones on the move. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 11895–11911.
- Adamson, B., Smogorzewska, A., Sigoillot, F.D., King, R.W., and Elledge, S.J. (2012). A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nat. Cell Biol.* 14, 318–328.
- Amin, A.D., Vishnoi, N., and Prochasson, P. (2012). A global requirement for the HIR complex in the assembly of chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 264–276.
- Anderson, H.E., Wardle, J., Korkut, S.V., Murton, H.E., López-Maury, L., Bäbler, J., and Whitehall, S.K. (2009). The fission yeast HIRA histone chaperone is required for promoter silencing and the suppression of cryptic antisense transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5158–5167.
- Avvakumov, N., Nourani, A., and Côté, J. (2011). Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol. Cell* 41, 502–514.
- Bensaude, O. (2011). Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription* 2, 103–108.
- Bodor, D., Rodríguez, M., and Moreno, N. (2012). Analysis of protein turnover by quantitative SNAP-based pulse-chase imaging. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 55, 8.8.1–8.8.34.
- Burgess, R.J., and Zhang, Z. (2013). Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 14–22.
- Choi, S.-Y., Jang, H., Roe, J.-S., Kim, S.-T., Cho, E.-J., and Youn, H.-D. (2013). Phosphorylation and ubiquitination-dependent degradation of CABIN1 releases p53 for transactivation upon genotoxic stress. *Nucleic Acids Res.* 41, 2180–2190.
- Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiácovo, M.P., and Elledge, S.J. (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 18475–18480.
- Chujo, M., Tarumoto, Y., Miyatake, K., Nishida, E., and Ishikawa, F. (2012). HIRA, a conserved histone chaperone, plays an essential role in low-dose stress response via transcriptional stimulation in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 287, 23440–23450.
- Churchman, L.S., and Weissman, J.S. (2011). Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* 469, 368–373.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179–204.
- Core, L.J., Waterfall, J.J., and Lis, J.T. (2008). Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322, 1845–1848.
- Dantuma, N.P., Groothuis, T.A.M., Salomons, F.A., and Neefjes, J. (2006). A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J. Cell Biol.* 173, 19–26.
- De Koning, L., Corpet, A., Haber, J.E., and Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 997–1007.
- Dunleavy, E.M., Almouzni, G., and Karpen, G.H. (2011). H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G₁ phase. *Nucleus* 2, 146–157.
- Ehmann, U.K., Cook, K.H., and Friedberg, E.C. (1978). The kinetics of thymine dimer excision in ultraviolet-irradiated human cells. *Biophys. J.* 22, 249–264.
- Filipescu, D., Szenker, E., and Almouzni, G. (2013). Developmental roles of histone H3 variants and their chaperones. *Trends Genet.* Published online July 2, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.002>.
- Gaillard, H., and Aguilera, A. (2013). Transcription coupled repair at the interface between transcription elongation and mRNP biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 141–150.
- Gaillard, P.H., Martini, E.M., Kaufman, P.D., Stillman, B., Moustacchi, E., and Almouzni, G. (1996). Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* 86, 887–896.
- Giglia-Mari, G., Zotter, A., and Vermeulen, W. (2011). DNA damage response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a000745.
- Green, C.M., and Almouzni, G. (2003). Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo. *EMBO J.* 22, 5163–5174.
- Hanawalt, P.C., and Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 958–970.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 1475–1485.
- Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* 29, 1446–1457.
- Ishii, T., Shiomi, Y., Takami, T., Murakami, Y., Ohnishi, N., and Nishitani, H. (2010). Proliferating cell nuclear antigen-dependent rapid recruitment of Cdt1 and CRL4Cdt2 at DNA-damaged sites after UV irradiation in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 285, 41993–42000.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Jensen, A., and Mullenders, L.H.F. (2010). Transcription factor IIS impacts UV-inhibited transcription. *DNA Repair (Amst.)* 9, 1142–1150.
- Jullien, J., Astrand, C., Szenker, E., Garrett, N., Almouzni, G., and Gurdon, J.B. (2012). HIRA dependent H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes. *Epigenetics Chromatin* 5, 17.
- Kapitzky, L., Beltrao, P., Berens, T.J., Gassner, N., Zhou, C., Wüster, A., Wu, J., Babu, M.M., Elledge, S.J., Toczyski, D., et al. (2010). Cross-species chemogenomic profiling reveals evolutionarily conserved drug mode of action. *Mol. Syst. Biol.* 6, 451.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707–719.
- Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A., and Almouzni, G. (2006). PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol. Cell* 24, 309–316.
- Luijsterburg, M.S., and van Attikum, H. (2011). Chromatin and the DNA damage response: the cancer connection. *Mol. Oncol.* 5, 349–367.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131, 887–900.
- Michod, D., Bartesaghi, S., Khelifi, A., Bellodi, C., Berlocchi, L., Nicotera, P., and Salomoni, P. (2012). Calcium-dependent dephosphorylation of the histone chaperone DAXX regulates H3.3 loading and transcription upon neuronal activation. *Neuron* 74, 122–135.
- Moné, M.J., Volker, M., Nikaïdo, O., Mullenders, L.H., van Zeeland, A.A., Verschure, P.J., Manders, E.M., and van Driel, R. (2001). Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Rep.* 2, 1013–1017.
- Nakazawa, Y., Yamashita, S., Lehmann, A.R., and Ogi, T. (2010). A semi-automated non-radioactive system for measuring recovery of RNA synthesis and unscheduled DNA synthesis using ethynyluracil derivatives. *DNA Repair (Amst.)* 9, 506–516.
- Nouspikel, T. (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 994–1009.
- Nouspikel, T. (2011). Multiple roles of ubiquitination in the control of nucleotide excision repair. *Mech. Ageing Dev.* 132, 355–365.
- Pankotai, T., Bonhomme, C., Chen, D., and Soutoglou, E. (2012). DNAPKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 276–282.

- Placek, B.J., Huang, J., Kent, J.R., Dorsey, J., Rice, L., Fraser, N.W., and Berger, S.L. (2009). The histone variant H3.3 regulates gene expression during lytic infection with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* *83*, 1416–1421.
- Polo, S.E., Roche, D., and Almouzni, G. (2006). New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* *127*, 481–493.
- Povlsen, L.K., Beli, P., Wagner, S.A., Poulsen, S.L., Sylvestersen, K.B., Poulsen, J.W., Nielsen, M.L., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., and Choudhary, C. (2012). Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1089–1098.
- Ray-Gallet, D., Woolfe, A., Vassias, I., Pellentz, C., Lacoste, N., Puri, A., Schultz, D.C., Pchelintsev, N.A., Adams, P.D., Jansen, L.E.T., and Almouzni, G. (2011). Dynamics of histone H3 deposition in vivo reveal a nucleosome gap-filling mechanism for H3.3 to maintain chromatin integrity. *Mol. Cell* *44*, 928–941.
- Schneiderman, J.I., Orsi, G.A., Hughes, K.T., Loppin, B., and Ahmad, K. (2012). Nucleosome-depleted chromatin gaps recruit assembly factors for the H3.3 histone variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *109*, 19721–19726.
- Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* *482*, 226–231.
- Shanbhag, N.M., Rafalska-Metcalf, I.U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S.M., and Greenberg, R.A. (2010). ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* *141*, 970–981.
- Skene, P.J., and Henikoff, S. (2013). Histone variants in pluripotency and disease. *Development* *140*, 2513–2524.
- Smerdon, M.J. (1991). DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* *3*, 422–428.
- Soria, G., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2012). Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol. Cell* *46*, 722–734.
- Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D.-A., Jones, D.T.W., Konermann, C., Pfaff, E., Tönjes, M., Sill, M., Bender, S., et al. (2012). Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* *22*, 425–437.
- Svejstrup, J.Q. (2010). The interface between transcription and mechanisms maintaining genome integrity. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 333–338.
- Szenker, E., Lacoste, N., and Almouzni, G. (2012). A developmental requirement for HIRA-dependent H3.3 deposition revealed at gastrulation in *Xenopus*. *Cell Rep.* *1*, 730–740.
- Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res.* *21*, 421–434.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2010). Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 264–275.
- Tornaletti, S. (2009). DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. *Cell. Mol. Life Sci.* *66*, 1010–1020.
- Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Beckscfort, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., et al.; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat. Genet.* *44*, 251–253.
- Yang, J.-H., Song, Y., Seol, J.-H., Park, J.Y., Yang, Y.-J., Han, J.-W., Youn, H.-D., and Cho, E.-J. (2011). Myogenic transcriptional activation of MyoD mediated by replication-independent histone deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, 85–90.
- Yang, X., Li, L., Liang, J., Shi, L., Yang, J., Yi, X., Zhang, D., Han, X., Yu, N., and Shang, Y. (2013). Histone acetyltransferase 1 promotes homologous recombination in DNA repair by facilitating histone turnover. *J. Biol. Chem.* *288*, 18271–18282.
- Zhang, X., Horibata, K., Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, S.-I., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M., Nohmi, T., et al. (2012). Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat. Genet.* *44*, 593–597.

Supplemental Information

EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

UV Irradiation

Cells grown on glass coverslips (VWR) were irradiated with UVC (254 nm) using a low-pressure mercury lamp. Conditions were set using a VLX-3W dosimeter (Vilbert-Lourmat). For global irradiation, cells in PBS were exposed to 10 J/m² unless stated otherwise. For local irradiation (Katsumi et al., 2001; Moné et al., 2001), cells were covered with a polycarbonate filter (5 µm pore size, Millipore) and irradiated with 150 J/m² UVC unless stated otherwise. For laser-induction of UVC damage (Dinant et al., 2007), cells were grown on quartz coverslips (SPI supplies) and irradiated for 50 ms using a 2 mW pulsed diode-pumped solid-state laser emitting at 266 nm (repetition rate up to 10 kHz, Rapp OptoElectronics, Hamburg GmbH) directly connected to a Zeiss LSM 700 confocal microscope adapted for UVC transmission with all-quartz optics. The laser was attenuated using a neutral density filter OD1 and focused through a 40x glycerol objective.

For UVA laser micro-irradiation, cells grown on glass coverslips were presensitized with 10 µM 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma-Aldrich) for 24 hr at 37°C. Damage was introduced with a 405 nm laser diode (3 mW) focused through a Plan-Apochromat 63X/1.4 oil objective to yield a spot size of 0.5-1 µm using a LSM710 NLO confocal microscope (Zeiss) and the following laser settings: 38% power, 50 iterations, scan speed 12.6 µsec/pixel.

Plasmids

The pHA vector and pHIRA-HA expression construct were obtained by replacing EYFP by a HA tag in pEYFP-N1 (Clontech) and pEYFP-N1-HIRA (human HIRA sequence from (Hall et al., 2001) subcloned into pEYFP-N1 and edited by Genescript). The pcDNA3-HA2-CUL4A expression vector was purchased from Addgene (#19907; Hu et al., 2008). The pcDNA3-HA-CUL4A DN expression vector (gift from Carlos de Noronha) encodes the first 545 amino acids of human CUL4A, which lack the neddylation site and the interaction domain with RING-box protein 1 (RBX1) (Sarikas et al., 2011) resulting in an inactive form for ubiquitylation. A Nuclear Localization Signal (NLS) from SV40 large T antigen was inserted upstream of the HA tag to compensate for the loss of a NLS due to the carboxy-terminal truncation. Primer sequences (Eurofins MWG Operon) are available upon request. All constructs were verified by direct sequencing.

Cell Extracts and Western Blot

Total extracts were obtained by scraping cells in Laemmli buffer (50 mM Tris HCl pH 6.8, 1.6% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 8% glycerol, 4% β-mercaptoethanol, 0.0025% bromophenol blue) followed by 5 min denaturation at 95°C. Cytosolic and nuclear extracts were obtained as previously described (Martini et al., 1998). The chromatin fraction was prepared by addition of benzonase (Novagen) to the pellet after nuclear extraction.

For western blot analysis, extracts were run on 4%–20% Mini-PROTEAN TGX gels (Bio-Rad) in running buffer (200 mM glycine, 25 mM Tris, 0.1% SDS) and transferred onto nitrocellulose membranes (Protran) with a Trans-Blot SD semidry transfer cell (Bio-Rad). Total proteins were revealed by MemCode staining (Pierce). Proteins of interest were probed using the appropriate primary (Table S2) and HRP (Horse Radish Peroxidase)-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch), detected using Super-Signal West Pico chemiluminescence substrates (Pierce). For semiquantitative analysis of western blot, serial dilutions of protein samples were loaded in order to obtain comparable signals in the linear range of detection, and signals were analyzed using Image J software.

Immunofluorescence

Cells grown on glass coverslips (VWR) were either fixed directly with 2% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS, or pre-extracted before fixation with 0.5% Triton X-100 in CSK buffer (Cytoskeletal buffer: 10 mM PIPES pH 7.0, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂). Pre-extraction was required only for visualizing CAF-1 subunit recruitment to damage sites, not for the other chaperones. For CPD staining, DNA was denatured with 0.5 M NaOH for 5 min. Samples were blocked in 5% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) in PBS supplemented with 0.1% Tween before incubation with primary (Table S2) and secondary antibodies conjugated to Alexa-Fluor 488, 594 or 680 (Invitrogen). Coverslips were mounted in Vectashield medium with DAPI (Vector) and observed with a Leica DML6000 epifluorescence microscope using a 40x or 63x oil objective. Percentages of positively stained cells were obtained by scoring at least 100 cells in each experiment. Statistical analyses using t test or one-way ANOVA followed by Tukey post-tests were performed with Prism 5 software. ns: nonsignificant, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001.

Nascent RNA Labeling

Nascent RNA labeling was systematically performed 71 hr post-siRNA transfection, and siRNA efficiency was confirmed both at 48 hr (time of the first irradiation) and 72 hr posttransfection (time of fixation). Cells were incubated in DMEM supplemented with 0.5 mM EU for 1 hr, rinsed in cold medium and in PBS before fixation in 2% paraformaldehyde. EU incorporation was revealed with Click-IT® RNA Imaging kits (Invitrogen) using either Alexa Fluor® 594 or 647 dyes according to manufacturer's instructions. Coverslips were mounted in Vectashield medium with DAPI (Vector). The mean EU fluorescence intensity per cell was obtained using ImageJ software by averaging the mean gray value of the EU signal measured in each nucleus. Nuclear segmentation was based on DAPI

staining. Results were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-tests with Prism 5 software. Statistical analyses of transcription recovery were performed for the final time-point in each experiment.

SNAP Labeling of Histones

Pre-existing SNAP-tagged histones were labeled by incubating cells with 2 μ M SNAP-cell TMR star (New England Biolabs) for 15 min (pulse) followed by a 30 min-incubation in fresh medium. For specific labeling of newly-synthesized histones, pre-existing histones were first quenched by incubating cells with 10 μ M SNAP-cell Block (New England Biolabs) for 30 min followed by a 30 min-wash in fresh medium and a 2 h-chase (if cells were pre-extracted before fixation) or a 30 min-chase in fresh medium (if cells were to be directly fixed afterward, i.e., when SNAP detection was combined with EU or CyclinA labeling). The pulse step was then performed as described above. Cells were irradiated before or after the pulse and then imaged in real time, or processed for immunostaining, or harvested in Laemmli buffer for electrophoresis and in-gel fluorescence analysis with a Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare-Life Sciences). The intensities of fluorescent bands corresponding to TMR star-labeled H3.3-SNAP were quantified using ImageJ software and normalized to Coomassie staining. The accumulation of new histones at sites of UVC laser micro-irradiation was quantified using ImageJ software. To correct for overall bleaching of the signal due to repetitive imaging, fluorescence intensities after background subtraction were normalized against intensities measured in an undamaged nucleus in the same field.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Cook, A.J.L., Gurard-Levin, Z.A., Vassias, I., and Almouzni, G. (2011). A specific function for the histone chaperone NASP to fine-tune a reservoir of soluble H3-H4 in the histone supply chain. *Mol. Cell* 44, 918–927.
- Corpet, A., De Koning, L., Toedling, J., Savignoni, A., Berger, F., Lemaître, C., O'Sullivan, R.J., Karlseder, J., Barillot, E., Asselain, B., et al. (2011). Asf1b, the necessary Asf1 isoform for proliferation, is predictive of outcome in breast cancer. *EMBO J.* 30, 480–493.
- Dinant, C., de Jager, M., Essers, J., van Cappellen, W.A., Kanaar, R., Houtsmuller, A.B., and Vermeulen, W. (2007). Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods. *J. Cell Sci.* 120, 2731–2740.
- Hall, C., Nelson, D.M., Ye, X., Baker, K., DeCaprio, J.A., Seeholzer, S., Lipinski, M., and Adams, P.D. (2001). HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol. Cell Biol.* 21, 1854–1865.
- Hu, J., Zacharek, S., He, Y.J., Lee, H., Shumway, S., Duronio, R.J., and Xiong, Y. (2008). WD40 protein FBW5 promotes ubiquitination of tumor suppressor TSC2 by DDB1-CUL4-ROC1 ligase. *Genes Dev.* 22, 866–871.
- Katsumi, S., Kobayashi, N., Imoto, K., Nakagawa, A., Yamashina, Y., Muramatsu, T., Shirai, T., Miyagawa, S., Sugiura, S., Hanaoka, F., et al. (2001). In situ visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1156–1161.
- Marheineke, K., and Krude, T. (1998). Nucleosome assembly activity and intracellular localization of human CAF-1 changes during the cell division cycle. *J. Biol. Chem.* 273, 15279–15286.
- Marteijn, J.A., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lans, H., Schwertman, P., Gourdin, A.M., Dantuma, N.P., Lukas, J., and Vermeulen, W. (2009). Nucleotide excision repair-induced H2A ubiquitination is dependent on MDC1 and RNF8 and reveals a universal DNA damage response. *J. Cell Biol.* 186, 835–847.
- Martini, E., Roche, D.M., Marheineke, K., Verreault, A., and Almouzni, G. (1998). Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *J. Cell Biol.* 143, 563–575.
- Sarkis, A., Hartmann, T., and Pan, Z.-Q. (2011). The cullin protein family. *Genome Biol.* 12, 220.

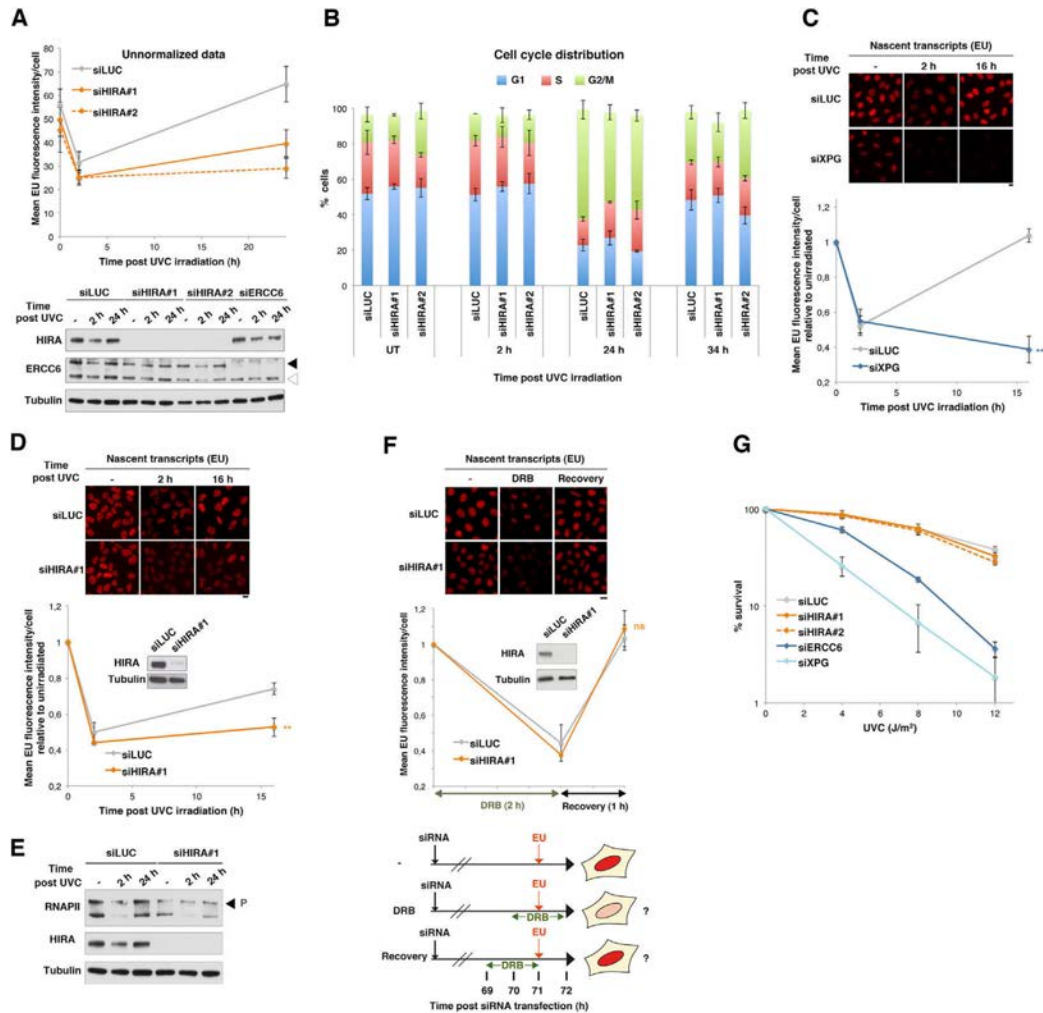


Figure S1. The Histone Chaperone HIRA Is Required for Transcription Recovery after DNA Damage, but Not after Inhibition of Transcription Elongation, Related to Figure 1

(A) Unnormalized data from Figure 1C. Transcriptional activity is measured by EU incorporation in UVC-irradiated HeLa cells treated with the indicated siRNAs (siLUC: control). siRNA efficiencies before (-), 2 hr and 24 hr post-UVC irradiation are controlled on the western blot panel. The moderate transcription defect already observed upon HIRA depletion in undamaged cells was exacerbated upon DNA damage reaching ca. 50% reduction compared to control. Error bars on the graph represent SEM from three independent experiments.

(B) Cell-cycle distribution of HeLa cells treated with the indicated siRNAs analyzed by flow cytometry at the indicated time-points after global UVC irradiation.

(C) Transcriptional activity is measured as in (A) in control (siLUC) versus repair deficient HeLa cells (siXPG) before (-), 2 hr and 16 hr after global UVC irradiation.

(D) Transcriptional activity is measured as in (A) in control (siLUC) versus HIRA deficient U2OS cells before (-), 2 hr and 16 hr after global UVC irradiation. The efficiency of HIRA depletion is controlled on the western blot panel.

(E) Levels and phosphorylation status of RNAPII large subunit analyzed by western blot on total extracts from UVC-irradiated HeLa cells treated with the indicated siRNAs. Black arrowhead: RNAPII hyperphosphorylated form.

(F) Transcriptional activity in DRB-treated HeLa cells transfected with the indicated siRNAs. EU incorporation is measured by fluorescence microscopy in untreated cells (-), during (DRB) and 1 hr after DRB treatment (Recovery) as shown on the experimental scheme. siRNA efficiencies are controlled on the western blot panel. Error bars on the graphs represent SEM from two independent experiments. Scale bars, 10 μ m.

(G) Clonogenic survival of HeLa cells treated with the indicated siRNAs in response to UVC irradiation. Error bars on the graph represent SD from three independent experiments.

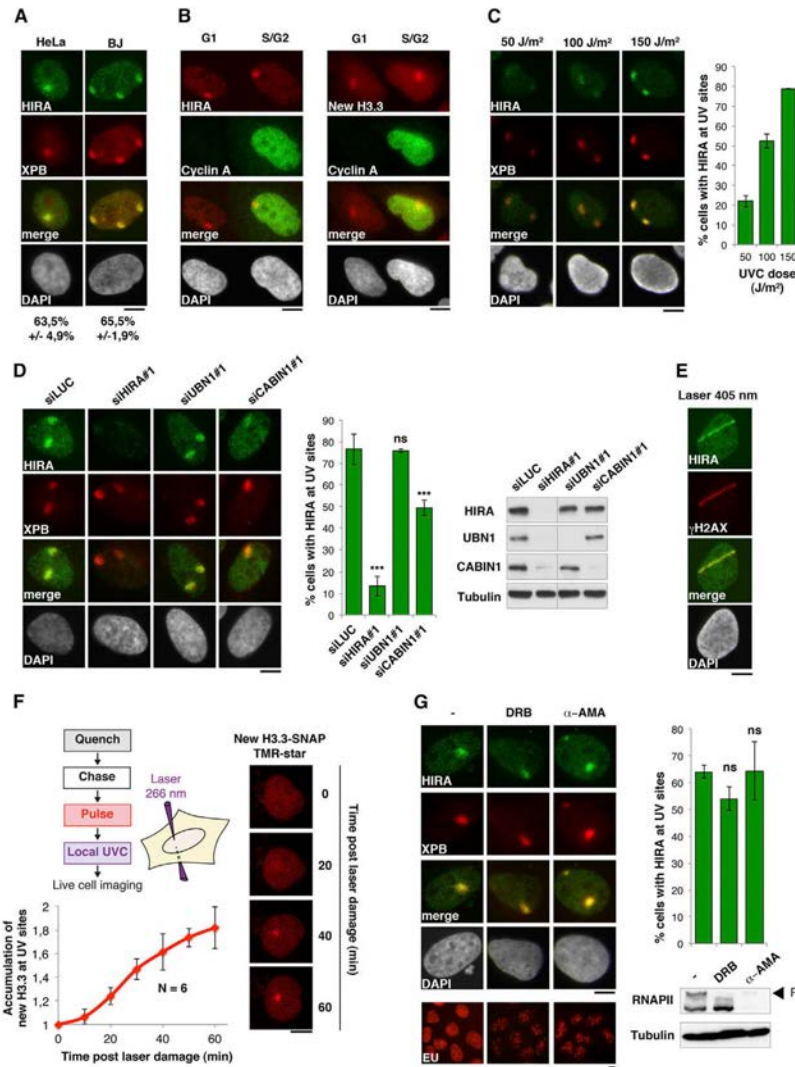


Figure S2. Characterization of HIRA and H3.3 Accumulation in DNA Damage Regions, Related to Figure 2

(A) Recruitment of HIRA to damaged chromatin regions (marked by XPB) analyzed by immunofluorescence 30 min after local UVC irradiation in the indicated cell lines.

(B) HIRA and new H3.3 accumulation in DNA damage regions analyzed 30 min and 1 hr after local UVC irradiation respectively in U2OS cells costained for Cyclin A to label S and G2 cells.

(C and D) Recruitment of HIRA to UVC regions analyzed as in A in U2OS cells exposed to increasing UVC doses (C) or treated with the indicated siRNAs (D). siRNA efficiencies are controlled on the western blot panel.

(E) Recruitment of HIRA to sites of UVA laser micro-irradiation (marked by γH2AX) analyzed by immunofluorescence 15 min after damage with a 405 nm laser in BrdU presensitized U2OS cells.

(F) Real-time accumulation of newly synthesized histones at sites of UVC laser micro-irradiation monitored in H3.3-SNAP U2OS cells as depicted on the scheme. N: cell number.

(G) Recruitment of HIRA to DNA damage regions analyzed as in A in U2OS cells treated with the indicated transcription inhibitors. α-AMA: α-Amanitin. Transcription inhibition is monitored by a reduced EU staining in the nucleoplasm (bottom immunofluorescence panel) and by the degradation of RNAPII large subunit or the loss of its hyperphosphorylated form (arrowhead, western-blot panel). We did not test the effect of DRB or α-Amanitin on new H3.3 deposition as these transcription inhibitors interfere with new histone synthesis. Error bars on the graphs represent SD from at least two independent experiments. Scale bars, 10 μm.

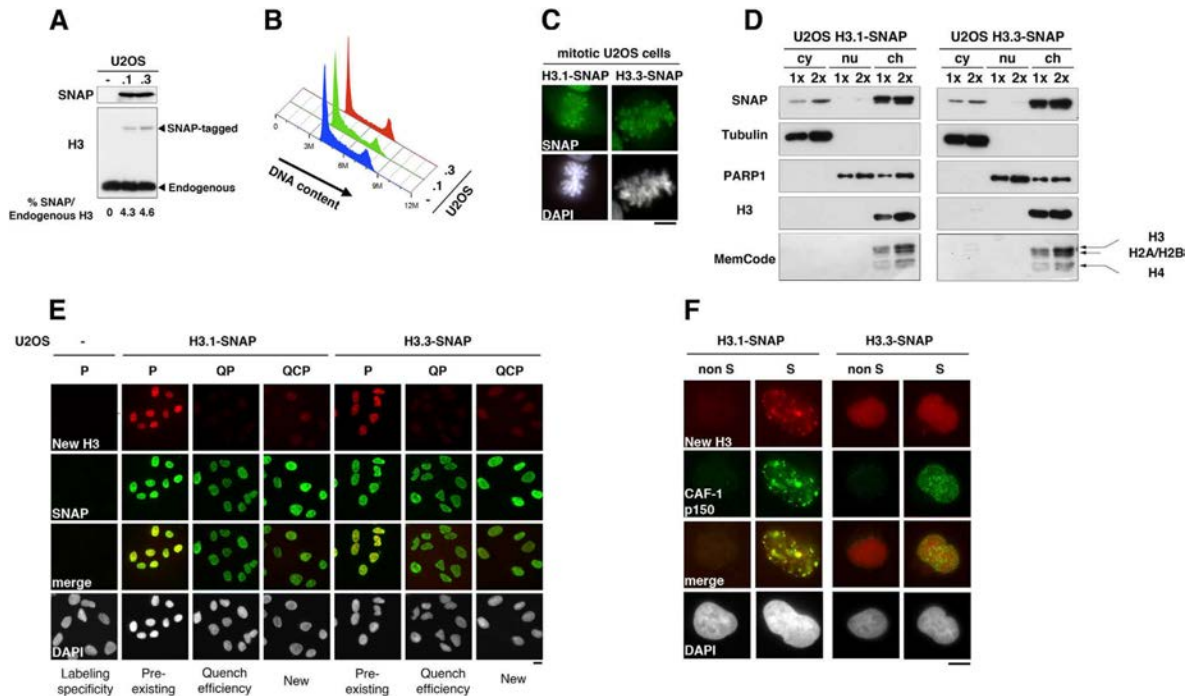


Figure S3. Characterization of U2OS Cell Lines Stably Expressing SNAP-Tagged H3 Variants, Related to Figure 3

(A) Western blot analysis of the expression levels of SNAP-tagged H3.1 (.1) and H3.3 (.3) proteins on total extracts from the corresponding U2OS cell lines. -: parental U2OS. SNAP-tagged histones represent less than 5% of total endogenous H3.
 (B) Cell-cycle profiles of the indicated cell lines analyzed by flow cytometry.
 (C and D) Incorporation of H3-SNAP into chromatin revealed by SNAP-tag immunostaining on mitotic chromosomes (C) and by western blot analysis of cytosolic (cy), nuclear (nu), and chromatin fractions (ch) prepared from the indicated cell lines (D).
 (E) Visualization of H3-SNAP by fluorescence microscopy in the indicated cell lines after in vivo labeling assays with TMR-star (red) in pulse (P), quench-pulse (QP) or quench-chase-pulse (QCP) experiments combined with SNAP-tag immunostaining (green). The pulse labels all pre-existing H3-SNAP, while the quench-chase-pulse labels only the new H3-SNAP synthesized during the chase step. Quenching efficiency is revealed by omitting the chase.
 (F) Incorporation profiles of new H3 variants analyzed by quench-chase-pulse experiments in U2OS cells. New H3.1 deposition is restricted to S phase and colocalizes with replication foci (marked by CAF-1 p150), while new H3.3 are deposited independently of replication. Scale bars, 10 μ m.

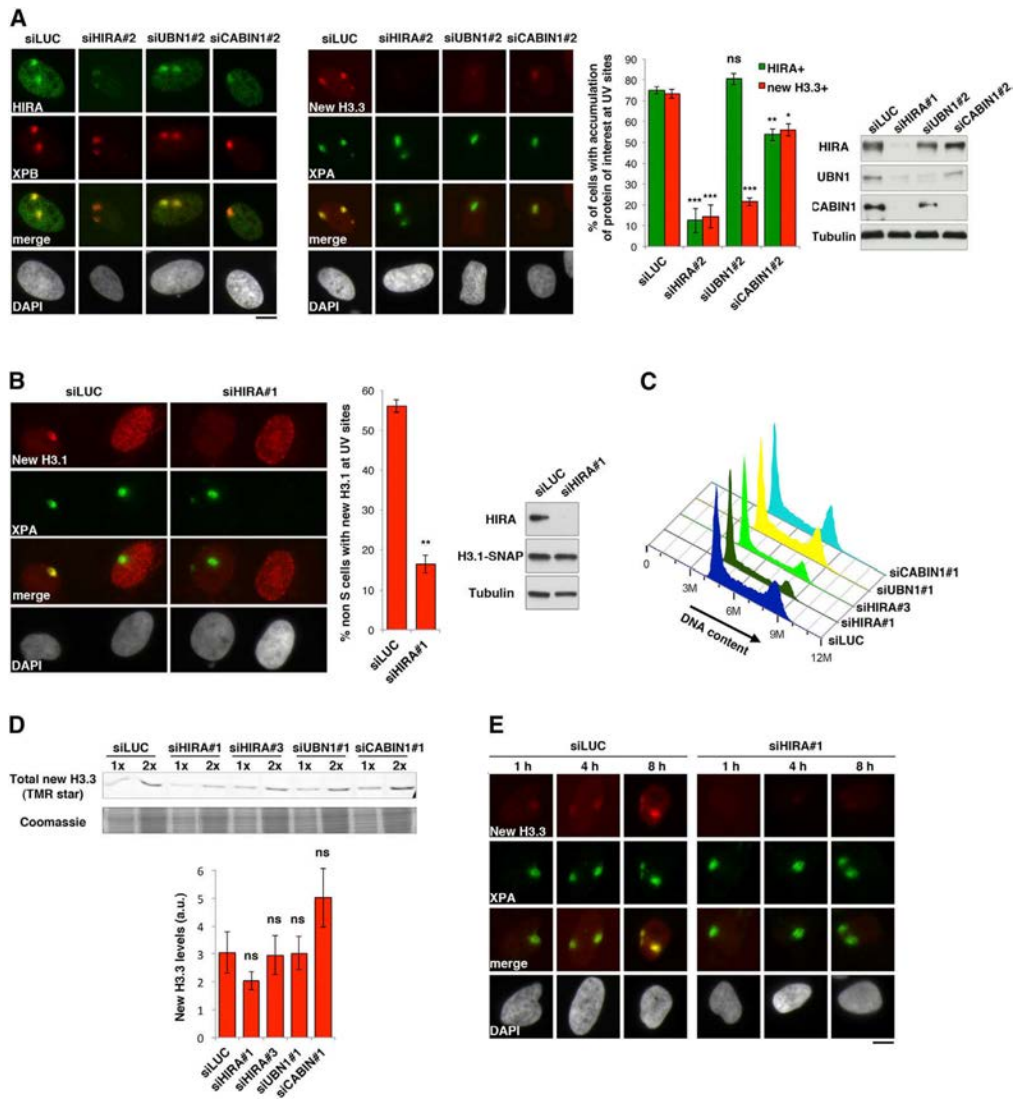


Figure S4. HIRA-Dependent H3 Accumulation in DNA-Damaged Chromatin, Related to Figure 3

(A) HIRA and new H3.3 accumulation at DNA damage analyzed as in Figures S2D and 3C in U2OS cells treated with a second set of siRNAs. siRNA efficiencies are shown on the western blot panel.

(B) New H3.1 accumulation in DNA damage regions (marked by XPA) 1 hr after local UVC irradiation in U2OS cells treated with the indicated siRNAs (siLUC: control). HIRA depletion affects new H3.1 deposition only at DNA damage, not at replication foci in S phase (right cell in each field). Similar results were obtained using siHIRA#2, siHIRA#3 and siHIRA 3' UTR (data not shown).

(C) Cell-cycle profiles of U2OS cells treated with the indicated siRNAs.

(D) In-gel fluorescence analysis of new H3.3-SNAP levels in total extracts from U2OS cells treated with the indicated siRNAs and subject to in vivo labeling with TMR-star (quench-chase-pulse experiment). Total levels of new H3.3 are normalized to Coomassie staining (loading control).

(E) New H3.3 accumulation in DNA damage regions (marked by XPA) analyzed by immunofluorescence at the indicated time points after local UVC irradiation in U2OS cells treated with the indicated siRNAs. Error bars on the graphs represent SD from two independent experiments. Scale bars, 10 μ m.

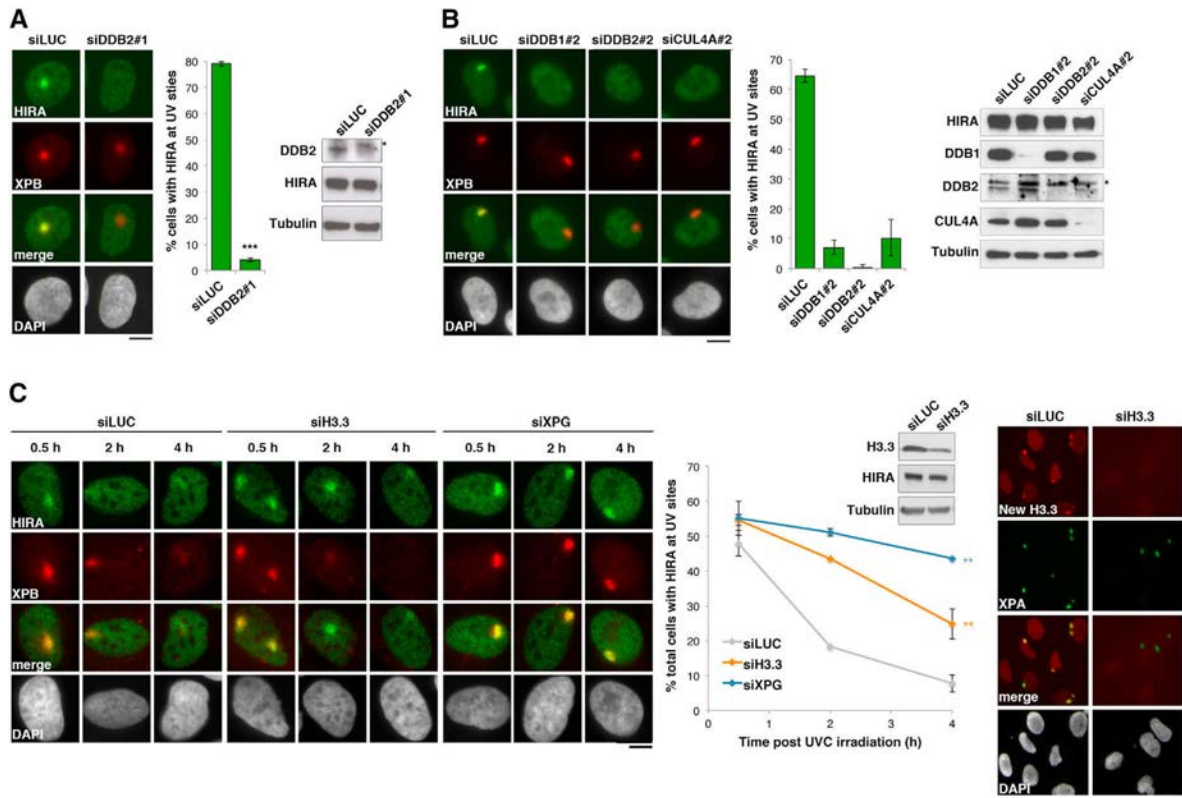


Figure S5. Regulation of HIRA Dynamics in UVC-Damaged Regions by NER Factors and New H3.3 Histones, Related to Figure 4
 (A and B) Recruitment of HIRA to DNA damage regions (marked by XPB) analyzed by immunofluorescence 30 min after local UVC irradiation in U2OS cells treated with the indicated siRNAs (siLUC: control). siRNA efficiencies are shown on the western blot panels. The asterisk indicates a nonspecific band.
 (C) HIRA release from UVC damage sites analyzed by immunofluorescence at the indicated time points after local UVC irradiation in U2OS cells treated with the indicated siRNAs. siH3.3 efficiency was controlled by analyzing new H3.3 accumulation in damaged regions (marked by XPA) 1 hr after local UVC irradiation in U2OS cells (right immunofluorescence panel) or by western blot on total extracts. Error bars on the graphs represent SD from two independent experiments. Scale bars, 10 μ m.

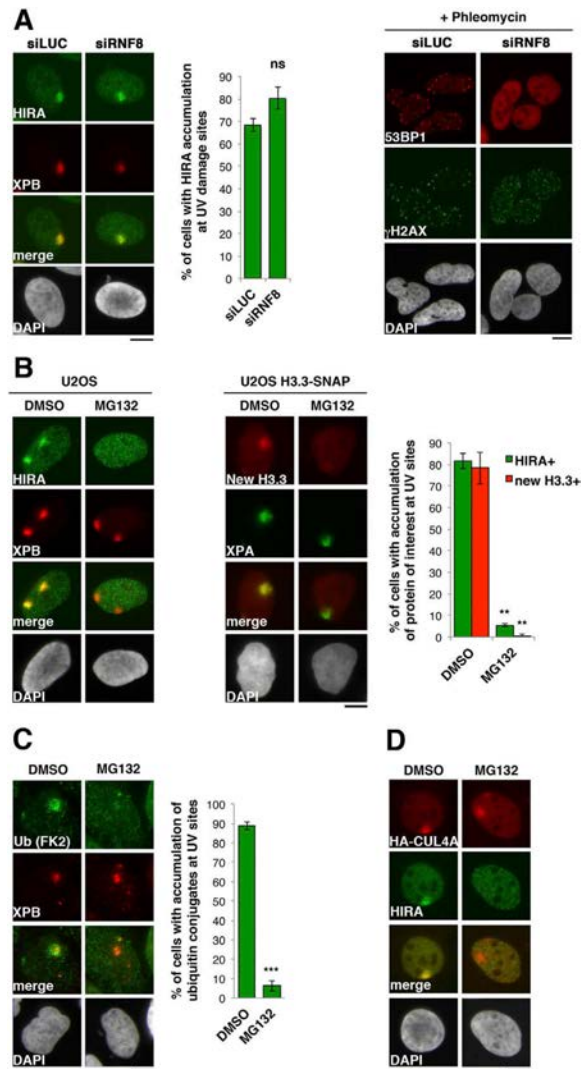


Figure S6. Ubiquitin-Dependent Regulation of HIRA-Mediated H3.3 Accumulation at DNA Damage Sites, Related to Figure 4
 (A) The recruitment of HIRA to DNA damage is not affected by depleting RNF8 (Ring Finger protein 8), another E3 ubiquitin ligase involved in the response to UVC irradiation (Marteijn et al., 2009), arguing for a specific role of DDB1-CUL4A containing complexes. The efficiency of RNF8 depletion is revealed on the right immunofluorescence panel by the lack of 53BP1 foci upon treatment with the radiomimetic agent phleomycin.
 (B) HIRA and new H3.3 accumulation in UVC damaged chromatin regions is severely impaired in U2OS cells treated with the proteasome inhibitor MG132, while their association to chromatin anywhere else in the nucleoplasm remains similar to control (DMSO: dimethyl sulfoxide, vehicle).
 (C) The efficiency of MG132 treatment is revealed by the lack of ubiquitin conjugates (Ub (FK2)) in UVC damage regions (marked by XPB) as monitored by immunofluorescence with FK2 antibody in U2OS cells.
 (D) Recruitment of HIRA and HA-CUL4A to DNA damage analyzed by immunofluorescence 30 min after local UVC irradiation in U2OS cells transiently transfected with HA-CUL4A and treated with MG132 or DMSO. Error bars on the graphs represent SD from two independent experiments. Scale bars, 10 μ m.

Table S1. siRNA Sequences, Related to Experimental Procedures

siRNA	Target sequence (5' -> 3')
siASF1a	AAGUGAAGAAUACGAUCAAGU
siASF1b	AACAACGAGUACCUCAACCCU
siCABIN1#1	GGAUUGAUUUGUCGGACUA
siCABIN1#2	GGAGAAGGAUUGCCGGUAC
siCAF-1 p60	AAUCUUGCUCGUCAUACCA
siCUL4A#1	GAAUCCUACUGCUGAUCGA
siCUL4A#2	ACAAGGCUCAAGACUUCAA
siDDB1#1	GCAAGGACCUGCUGUUUUAU
siDDB1#2	GACAAGAGTTCTCATGTTA
siDDB2#1	UCACUGGGCUGAAGUUUAA
siDDB2#2	UCAGUUCGCUUAAUGAAUU
siERCC6	GAAGAGUUGUCAGUGAUUA
siHIRA#1	GGAGAUGACAAACUGAUUA
siHIRA#2	GAAGGACUCUCGUCUCAUG
siHIRA#3	CAUGGGACCCUGUUGGUAA
siHIRA 3'UTR	GACCUAAGACCUAUGUAAA
siH3.3	1:1 combination of CUACAAAAGCCGCUCGCAA (siH3.3 A) and GCUAAGAGAGUCACCAUCAU (siH3.3 B)
siLUC	CGUACGCGGAAUACUUCGA
siRNF8	UGGACAAUUAUGGACAACA
siUb	1:1 combination of ACACCAUUGAGAAUGUCAAA and AGGCCAAGAUCAGGAUAA
siUBN1#1	AUACAGGACUUGAUCGAUA
siUBN1#2	GCAUAAGCCUGUUGCGGUC
siXPC	GCAAAUGGCUUCUAUCGAA
siXPG	GAAAGAAGAUGCUGAAACGU

Table S2. Primary Antibodies, Related to Experimental Procedures

Antibody target	Raised in	Supplier/Reference	Application
53BP1	rabbit	Novusbio (NB100-304)	IF
ASF1a	rabbit	(Corpet et al., 2011)	IF/WB
ASF1b	rabbit	(Corpet et al., 2011)	IF/WB
CABIN1	rabbit	Abcam (ab3349)	IF/WB
CAF-1 p150	mouse	Abcam (ab7655; clone ss1 1-13)	IF
CAF-1 p60	rabbit	(Marheineke and Krude, 1998)	IF/WB
CPD	mouse	Kamiya Biomedical Company (mc-062; clone KTM 53)	IF
CUL4A	rabbit	Bethyl laboratories (A300-739A)	WB
CyclinA	rabbit	Santa Cruz Biotechnology (sc-751)	IF
DAXX	rabbit	Santa Cruz Biotechnology (sc-7152)	IF
DDB1	rabbit	Abcam (ab21080)	WB
DDB2	rabbit	Santa Cruz Biotechnology (sc-25368)	WB
ERCC6	rabbit	Santa Cruz Biotechnology (sc-25370)	WB
γH2AX	mouse	Millipore (05-636; clone JBW301)	IF
H3	rabbit	Epitomics (1326-1; clone E173-58)	WB
H3.3	mouse	Abnova (H00003021-M01; clone 2D7-H1)	WB
HA	rat	Roche (11867423001; clone 3F10)	IF/WB
HIRA	mouse	Active Motif (39558; clone WC119.2H11)	IF/WB
NASP	rabbit	(Cook et al., 2011)	IF
PARP1	rabbit	Cell Signaling (9542)	WB
RNAPII	rabbit	Santa Cruz Biotechnology (sc-899)	WB
SNAP	rabbit	Open Biosystem (CAB4255)	IF/WB
Tubulin	mouse	Sigma-Aldrich (T9026; clone DM1A)	WB
Ubiquitin	mouse	Covance (MMS-257P-0200; clone P4D1)	WB
Ubiquitin conjugates	mouse	Enzo Life Sciences (PW8810-0500; clone FK2)	IF
UBN1	rabbit	Abcam (ab101282)	IF
UBN1	mouse	Abcam (ab84953; clone UBN1-02)	WB
XPA	mouse	BD biosciences (556453; clone 12F5)	IF
XPB	rabbit	Santa Cruz Biotechnology (sc-293)	IF

3. Redistribution conservatrice des histones H3 parentales couplée à la détection des dommages UVC

Epigenome stability after DNA damage through conservative redistribution of parental histones coupled to repair.

Maintien de l'intégrité de l'épigénome après dommages de l'ADN grâce à une redistribution conservatrice des histones parentales couplée à la réparation de l'ADN.

Salomé Adam*, Juliette Dabin*, Odile Chevallier, Olivier Leroy, Olivier Renaud, Geneviève Almouzni, Sophie E. Polo

Manuscrit en préparation

* Travail en collaboration avec Juliette Dabin, étudiante en thèse 1^{ère} année

3.1. Dynamique à court terme des variants parentaux de l'histone H3 aux sites de dommages induits par les UVC

En parallèle de notre analyse des histones néo-synthétisées, nous avons abordé l'étude du devenir des histones parentales dans les régions de chromatine endommagées aux UVC grâce à deux approches complémentaires développées dans des cellules humaines. Nous avons d'abord mis à profit la technologie SNAP afin de marquer spécifiquement les anciennes histones H3.3 et de suivre leur dynamique en temps réel après micro-irradiation laser UVC (**Figure 22**). Nous avons alors observé une **diminution rapide de l'intensité du marquage des histones préexistantes localisées aux sites de lésions générées par les UVC** (**Figure 1**). Cette perte locale de signal est détectable dans la totalité des cellules irradiées, qu'elles soient en cours de réplication de l'ADN ou non (**Figure S1**). De plus, nous avons vérifié que cette perte n'était **pas due à un photo-blanchiment de la fluorescence par le laser**, puisque irradier des cellules préalablement fixées au paraformaldéhyde n'induit pas de baisse de signal (**Figure S1**). Ces résultats démontrent que la perte d'intensité du marquage des anciennes H3.3 correspond effectivement à un dynamique accrue de ces histones dans la chromatine lésée. Cette perte atteint son maximum autour de 40%, 10-15 minutes post-irradiation (**Figure 1**).

Ces données furent ensuite confirmées grâce à un système complémentaire de suivi des histones parentales, par photo-activation d'histones étiquetées PA-GFP (Photo-Activable Green Fluorescent Protein) deux jours avant micro-irradiation laser UVC (**Figure S1**). De plus, la **perte d'intensité de marquage des anciennes histones** dans les minutes qui suivent l'irradiation locale aux UVC **n'est pas spécifique du variant d'histone H3.3** car une perte de fluorescence associée aux variants parentaux H3.1-SNAP a également été détectée (**Figure**

S1). Donc, quelle que soit la stratégie utilisée pour marquer les histones préexistantes, nos résultats mettent en lumière une **dynamique accrue, rapide et locale des histones H3 parentales dans la chromatine lésée aux UVC.**

Afin de mieux caractériser cette dynamique, nous avons d'abord cherché à déterminer si la baisse observée d'intensité du marquage des histones H3 préexistantes aux sites de lésions UVC correspond à une véritable perte de ces histones de la chromatine endommagée, ce qui conduirait à une perte de l'information parentale qu'elles véhiculent. Nous avons alors analysé les variations d'intensité du signal associé aux anciennes histones H3.3 après irradiation locale aux UVC non seulement dans les régions de chromatine lésées mais aussi dans le volume nucléaire entier (**Figure 2** & détails techniques de l'expérience dans le manuscrit ci-joint). Aucune perte détectable de signal dans le volume nucléaire entier n'ayant été détectée, nous pouvons donc conclure que les **histones parentales « mobilisées » 15 minutes après irradiation aux UVC sont toujours présentes dans le noyau des cellules endommagées et ne font donc pas l'objet d'une dégradation massive.**

Nous avons ensuite affiné notre analyse par mesure quantitative de la distribution du signal correspondant aux anciennes histones H3.3 autour de la zone d'impact du laser. Nous avons alors remarqué que la perte de fluorescence au centre de la région de chromatine endommagée aux UVC s'accompagne d'un gain de fluorescence autour de cette région, qui contrebalance la perte de marquage (**Figure 2**). Nous avons de plus confirmé ces résultats après photo-activation locale des histones H3.3-PA-GFP (**Figure S2**). Le fait que les histones parentales soient redistribuées en périphérie de la zone d'impact du laser UVC suggère que ces histones ne sont pas solubilisées, car si c'était le cas, elles n'occuperaient pas une région bien définie dans le noyau des cellules irradiées. Conformément à cette hypothèse, un traitement au détergent de cellules vivantes après irradiation locale aux UVC ne permet pas d'extraire les anciennes histones redistribuées autour de la zone d'impact laser (**Figure S2**), confirmant ainsi que ces histones sont toujours associées à de la chromatine.

Enfin, la redistribution des histones parentales post-irradiation aux UVC s'accompagne d'une expansion de la zone d'anciennes histones marquées (**Figure 2**). En accord avec cette expansion, nous avons détecté une diminution de 20% de la densité d'ADN dans les régions de chromatine lésées 15 minutes après irradiation (**Figure 2**). La chromatine est donc au moins en partie décompactée en réponse aux dommages de l'ADN.

En résumé, notre étude de la dynamique à court terme des histones H3 parentales en réponse à une micro-irradiation laser UVC a permis de révéler une **redistribution conservatrice des histones préexistantes en périphérie de la zone d'impact laser, qui s'accompagne d'une décondensation de la chromatine lésée.**

3.2. Aspects mécanistiques

Nous avons ensuite cherché à comprendre le mécanisme qui contrôle la dynamique des histones parentales en réponse à une irradiation aux UVC. Cette analyse s'est déroulée en deux phases : (1) étude de l'importance de la réparation des dommages par la voie NER (**Figure 3**) et (2) recherche d'un éventuel couplage entre les dynamiques à court terme des histones parentales et néo-synthétisées dans les régions de chromatine endommagées aux UVC (**Figure 4**).

Nous avons dans un premier temps examiné l'impact de la diminution d'expression de différents facteurs de réparation NER sur la dynamique des histones parentales en réponse aux UVC. Comme la perte de densité des anciennes histones H3 apparaît dans les minutes qui suivent une irradiation localisée aux UVC (**Figure 1**), nous avons décidé d'étudier en priorité le rôle des facteurs précoces du NER. Alors qu'une baisse par ARN interférence de l'expression de la protéine CSB, impliquée dans la reconnaissance des dommages couplée à la transcription, n'a pas d'effet manifeste sur la dynamique des histones H3.3 préexistantes en réponse à une micro-irradiation laser UVC (**Figure S3**), diminuer l'expression du facteur DDB2, requis pour la détection des lésions par la voie GG-NER, réduit de manière conséquente la perte de fluorescence issue des anciennes histones H3.3 aux sites de lésions (**Figures 3 & S3**). Ces résultats démontrent que la **perte de densité des histones parentales aux sites de dommages de l'ADN nécessite la détection de ces lésions par la voie GG-NER**. Par contre, aucun défaut majeur de cette dynamique n'a été détecté après réduction de l'expression de partenaires de DDB2 participant au complexe d'ubiquitylation UV-DDB, les protéines DDB1 et CUL4A (**Figure 3**). Conformément à ces données, la perte de densité des anciennes histones dans les régions de chromatine lésées n'est que faiblement altérée après inhibition du protéasome (**Figure S3**), traitement cellulaire qui perturbe l'ensemble des réactions *de novo* d'ubiquitylation. L'ensemble de ces expériences nous permet de conclure que **l'activité d'ubiquitylation du complexe UV-DDB ne joue pas un rôle majeur dans la perte locale de densité des histones parentales après irradiation localisée aux UVC**.

Afin de confirmer le rôle prépondérant du facteur de réparation DDB2, nous avons démontré que son accrochage artificiel à la chromatine en l'absence de dommages de l'ADN conduit à une perte de densité des histones H3.3 parentales (**Figure 3**). Le facteur précoce de réparation **DDB2 est donc suffisant pour assurer une dynamique accrue des anciennes histones dans les régions de chromatine sur lesquelles il est recruté**.

Comme DDB2 contrôle non seulement la dynamique des variants H3.3 préexistants mais aussi l'incorporation par le chaperon HIRA d'histones H3.3 néo-synthétisées après micro-irradiation laser UVC (cf. partie 1.2), nous avons décidé de comparer en détails la

cinétique de perte de densité des H3.3 parentales avec celle d'accumulation de nouvelles H3.3 dans les régions de chromatine endommagées. Grâce à la technologie SNAP, il est en effet possible de suivre en simultané la dynamique des anciennes et des nouvelles histones par imagerie sur cellules vivantes (**Figure 22**). Nous avons alors mis en évidence que **la perte de densité des histones parentales précède la mise en place des nouvelles histones** aux sites d'irradiation localisée aux UVC (**Figure 4**). De plus, une transfection transitoire de siARN ciblant les deux gènes codant pour l'histone H3.3, qui permet de diminuer préférentiellement le niveau protéique des histones H3.3 néo-synthétisées sans affecter celui des histones préexistantes, n'empêche pas la perte de densité des histones parentales dans les régions de chromatine lésées aux UVC (**Figure 4**). Ces résultats révèlent donc que **la mise en place *de novo* d'histones H3.3 n'est pas requise pour la perte de densité des anciens variants H3.3 des régions de chromatine endommagées.**

En conclusion, l'ensemble de nos données démontre **que DDB2 est un facteur critique de la dynamique précoce des histones parentales**, puisqu'il est nécessaire et suffisant pour la redistribution UVC-induite de ces histones.

3.3. Discussion : comment DDB2 favorise t-il la redistribution spatiale des histones parentales ?

Dans cette partie, nous avons démontré que la protéine de réparation DDB2 est un facteur clé de la dynamique des histones parentales après induction de dommages UVC. Il est aussi intéressant de noter que DDB1 et CUL4A, membres avec DDB2 du complexe UV-DDB, ainsi que l'activité de ce complexe, bien que nécessaires pour la mise en place de nouvelles histones H3.3 dans les régions de chromatine endommagées (cf. partie 1.2), ne jouent qu'un rôle mineur dans la perte locale de densité des histones H3.3 parentales (**Figure 3**). En accord avec ces résultats, en absence de dommages de l'ADN, une construction tronquée de DDB2 ayant perdu sa capacité d'interagir avec DDB1 et CUL4A, favorise l'expansion de la chromatine de manière similaire à la forme sauvage de DDB2 ((Luijsterburg et al., 2012) et données non montrées). D'un point de vue fonctionnel, perturber l'ensemble des réactions *de novo* d'ubiquitylation réduit de manière significative le recrutement de XPC aux sites de lésions sans effet majeur sur la perte de densité des histones parentales (données non montrées et (Wang et al., 2005)). Donc, la dynamique précoce des histones parentales n'est pas suffisante pour assurer une détection efficace des dommages par le facteur de réparation XPC et des recherches complémentaires sont nécessaires afin de déterminer comment les réactions d'ubiquitylation agissent de concert avec la dynamique de la chromatine DDB2-dépendante afin d'assurer une réparation efficace des lésions.

De plus, comment DDB2, de manière indépendante des autres sous-unités du complexe UV-DDB, favorise l'ouverture de la chromatine endommagée et/ou l'éloignement des nucléosomes de l'ADN lésé reste aujourd'hui une question en suspens. Il pourrait agir seul, en déplaçant les nucléosomes grâce à sa forte affinité pour l'ADN endommagé (Kulaksiz et al., 2005). Cependant, des analyses structurales ont révélé que la fixation de DDB2 sur l'ADN lésé est compatible avec une organisation de l'ADN au sein de nucléosomes (Scrima et al., 2008; Yeh et al., 2012), ce qui suggère que cette fixation ne serait pas suffisante pour permettre la désorganisation de la chromatine lésée. Vu que la protéine DDB2 ne semble posséder ni de domaine ATPase/hélicase ni de domaine d'interaction avec les histones, nous penchons plutôt vers une hypothèse selon laquelle DDB2 assurerait le recrutement de facteurs directement impliqués dans la dynamique de la chromatine, afin de « mobiliser » les histones dans les régions de chromatine lésées. Une approche candidat basée sur l'analyse de l'effet de la baisse d'expression de facteurs associés à la réponse précoce aux rayons UVC dans la littérature (cf. introduction partie 3) – chaperons d'histones, facteurs de remodelage de la chromatine ou enzymes de modifications d'histones – a été infructueuse, peut être à cause d'une redondance fonctionnelle entre facteurs (données non montrées). Le développement d'une approche protéomique non biaisée, identifiant de nouveaux partenaires de DDB2, devrait permettre de mieux comprendre comment ce facteur de réparation contrôle la redistribution spatiale des histones parentales en périphérie des sites endommagés de chromatine.

4. Retour d'histones H3 parentales couplé à la réparation des lésions induites par les UVC

Epigenome stability after DNA damage through conservative redistribution of parental histones coupled to repair.

Maintien de l'intégrité de l'épigénome après dommages de l'ADN grâce à une redistribution conservatrice des histones parentales couplée à la réparation de l'ADN.

Salomé Adam*, Juliette Dabin*, Odile Chevallier, Olivier Leroy, Olivier Renaud, Geneviève Almouzni, Sophie E. Polo

Manuscrit en préparation

* Travail en collaboration avec Juliette Dabin, étudiante en thèse 1^{ère} année

4.1. Dynamique à long terme des histones H3.3 parentales et néo-synthétisées aux sites de dommages induits par les UVC

Pour finaliser cette étude, nous avons décidé d'examiner les processus contrôlant la restitution de l'architecture chromatinienne en réponse à un stress génotoxique. Pour cela, nous avons étendu notre analyse précédente de la dynamique des histones H3.3 parentales et néo-synthétisées à des temps plus longs après micro-irradiation laser (**Figure 5**). Nous avons alors mis en évidence que **des histones parentales « reviennent » dans les régions de chromatine en cours de réparation où elles se mélangent aux nouvelles histones incorporées**. Ce « retour » traduit une dynamique accrue des histones parentales aux sites de lésions puisque nous avons mesuré 80% de retour de signal correspondant aux anciennes H3.3 dans la région de chromatine endommagée contre 20% après photo-blanchiment d'une région non endommagée du même noyau cellulaire (valeur cohérente avec des données FRAP sur la mobilité des histones H3 dans les cellules humaines, (Kimura and Cook, 2001)) (**Figure S4**). Nous avons enfin confirmé ces résultats par photo-activation des histones H3.3-PA-GFP (**Figure S4**).

4.2. Aspects mécanistiques

Nous avons ensuite cherché à déterminer les mécanismes contrôlant le « retour » d'histones parentales dans la chromatine réparée. Ayant constaté que ce dernier corrèle avec la réparation des dommages (réparation de l'ADN indiquée par le départ des protéines de détection des lésions XPC et DDB2 des sites lésés aux UVC, **Figure 5**), nous avons alors testé l'influence des étapes tardives de la réparation NER sur la dynamique des anciennes histones H3.3 après micro-irradiation laser UVC. Ainsi, diminuer l'expression de

l'endonucléase XPG, facteur tardif du NER, n'a pas d'effet manifeste sur la redistribution rapide des histones parentales (**Figure S3**), mais à plus long terme, elle perturbe à la fois le « retour » d'anciennes histones et le départ du facteur précoce de réparation DDB2 des régions de chromatine endommagées (**Figure 5**). Ces résultats démontrent donc que **le « retour » d'histones parentales dans la chromatine lésée nécessite une réparation efficace des dommages**. De plus, en mettant à profit le système artificiel d'accrochage à la chromatine de DDB2 précédemment décrit (cf. partie 3), nous avons révélé que **décrocher DDB2 de la chromatine est suffisant pour permettre le « retour » d'histones H3.3 parentales** en l'absence de lésions de l'ADN (**Figure 5**).

En conclusion, nos données apportent un éclairage nouveau sur les mécanismes qui contrôlent la restitution de la structure de la chromatine, puisqu'en plus de la mise en place de nouvelles histones, des histones H3.3 parentales « reviennent » dans la chromatine en cours de réparation, de manière couplée au départ des facteurs précoces du NER.

4.3. Discussion : y-a-t-il un recyclage des histones parentales « mobilisées » ?

Le « retour » d'anciennes histones dans la chromatine en réparation contribuerait au maintien de l'identité de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN (voir modèle en **Figure 5**). Cependant, pour qu'une telle mémoire existe, il faudrait que les histones que nous observons « revenir » dans les régions de chromatine endommagées correspondent aux histones initialement présentes puis redistribuées autour des sites lésés, ce que nos résultats ne permettent pas actuellement de déterminer. Afin de tester cette hypothèse de recyclage des histones parentales « mobilisées », il serait intéressant de marquer spécifiquement les histones incorporées dans la région de chromatine qui sera endommagée (ce qui pourrait être réalisé soit par photo-activation locale des histones H3.3-PA-GFP (voir détails techniques en **Figure S2**), soit par photo-blanchiment de la fluorescence associée à H3.3-SNAP dans tout le noyau cellulaire sauf dans la zone à irradier (voir détails techniques en **Figure 2**). D'autre part, il serait important d'analyser plus en détails le devenir des nouvelles histones incorporées, car elles sont susceptibles de mettre en péril l'intégrité de l'information portée par la chromatine avant stress génotoxique (aspect discuté dans les conclusions & perspectives, partie 2.2).

Enfin, il serait judicieux d'approfondir l'étude des mécanismes permettant le « retour » d'anciennes histones dans la chromatine en réparation : ce « retour » traduit-il une re-fermeture de la chromatine et/ou un repositionnement des nucléosomes préexistants ? Les facteurs impliqués dans le « retour » d'histones parentales sont-ils les mêmes que ceux contrôlant la redistribution spatiale des anciennes histones en périphérie des sites lésés (comme c'est le cas de DDB2, cf. partie 3.3) ? La mise en place précoce de nouvelles histones H3 favorise-t-elle le « retour » des histones H3 parentales ?

**Epigenome stability after DNA damage through conservative redistribution
of parental histones coupled to repair**

CONFIDENTIAL / WORK IN PROGRESS

Salomé Adam^{1,2,4}, Juliette Dabin^{1,4}, Odile Chevallier¹, Olivier Leroy³, Olivier Renaud³,
Geneviève Almouzni², Sophie Polo^{1,*}

¹ Laboratory of Epigenome Integrity, Epigenetics & Cell Fate Centre, UMR7216 CNRS, Paris
Diderot University, Sorbonne Paris Cité, 75205 Paris cedex 13, France

² Laboratory of Chromatin Dynamics, UMR3664 CNRS, Institut Curie, PSL Research
University, 75248 Paris cedex 5, France

³ Cell and tissue imaging facility, UMR3215/U934 PICT-IBiSA, Institut Curie, 75248 Paris
cedex 5, France

⁴ Co-first author

*Correspondence: sophie.polo@univ-paris-diderot.fr (S.E.P)

SUMMARY

Chromatin integrity, although critical for cell function and identity, is challenged by DNA damage. Understanding how the original chromatin architecture and the information that it conveys are preserved after genotoxic stress is thus of fundamental importance. Here, by exploiting real-time tracking of parental and newly synthesized H3 histones after local UVC irradiation in human cells, we show that parental histones are not massively evicted from damaged chromatin and replaced by new histones, but instead are rapidly redistributed near damaged regions. Most parental histones subsequently recover and mix with new histones in repairing chromatin. Parental histone redistribution and recovery are both tightly coordinated with repair progression through the UVC damage sensor DDB2 (DNA Damage Binding protein 2). We propose that such conservative dynamics of parental histones in damaged chromatin contribute to keep a memory of the original chromatin landscape, which is key for epigenome stability in response to DNA damage.

HIGHLIGHTS

- Parental H3 histones redistribute to the periphery of UVC-damaged regions
- Parental histone redistribution is controlled by the damage sensor DDB2
- Most parental histones recover and mix with new histones in repairing chromatin
- Recovery of parental histones is coupled to repair progression through DDB2 release

INTRODUCTION

Cellular genomes are constantly exposed to various sources of DNA damage (Ciccia and Elledge, 2010; Hoeijmakers, 2009; Jackson and Bartek, 2009), which threatens not only genome stability but also the integrity of their organization into chromatin. Chromatin basic unit is the nucleosome core particle where DNA is wrapped around an octamer of histone proteins comprising an (H3-H4)₂ tetramer flanked by two H2A-H2B dimers (Kornberg, 1977). Variations at the level of this repetitive unit, through histone variants and post-translational modifications (Bannister and Kouzarides, 2011; Maze et al., 2014; Talbert and Henikoff, 2010), as well as further chromatin compaction, constitute a major source of information that dictate gene expression and cell identity (Probst et al., 2009). How chromatin is reorganized in response to DNA damage while preserving the information that it carries is thus a fundamental issue.

Our current view of chromatin dynamics in response to DNA damage in human cells is based on the Access-Repair-Restore (ARR) model (Green and Almouzni, 2002; Smerdon, 1991; Soria et al., 2012). According to this model, chromatin is first disorganized in response to DNA damage, which facilitates access to repair factors, followed by restoration of chromatin structure. Because chromatin restoration involves the deposition of newly synthesized histones in response to UVC damage (Adam et al., 2013; Dinant et al., 2013; Polo et al., 2006), it was postulated that at least a subset of parental histones were evicted from chromatin during the Access step, which entails a potential loss of the original epigenetic information (Figure 1A). Additionally, recent reports provide evidence for nucleosome destabilization and histone eviction in response to UVC irradiation (Lan et al., 2012; Wang et al., 2006), and also during DNA double-strand break (DSB) repair (Goldstein et al., 2013; Xu et al., 2010). A massive loss of parental histones from damaged chromatin could be particularly detrimental for epigenome maintenance.

For understanding how chromatin integrity is preserved in response to genotoxic stress, it is thus critical to examine the fate of parental histones that were present in chromatin before damage infliction and carry the original epigenetic information. Here, we developed two complementary approaches for tracking parental histone dynamics in response to UVC damage in human cells, focusing on histone H3 variants. Challenging the existing model, for chromatin rearrangements in response to DNA damage, we show that, rather than being evicted from damaged chromatin, parental histones redistribute in a conservative manner and subsequently recover in damaged chromatin regions where they mix with newly synthesized histones. Our mechanistic studies demonstrate that both the redistribution and recovery of parental histones are tightly coordinated with repair progression through the UVC damage sensor protein DDB2. Altogether, our data strongly support a conservative model by which

parental histone dynamics coupled to DNA damage repair contribute to the maintenance of epigenome integrity during the response to UVC damage.

RESULTS

Rapid mobilization of parental H3 histones from UVC-damaged chromatin regions

In order to determine the fate of pre-existing histones in damaged chromatin regions, we developed two complementary approaches combining UVC laser micro-irradiation with specific tracking of parental histones in live cells. We first took advantage of the SNAP-tag technology to fluorescently label old histones 48 h prior to irradiation (see Figure 1A & experimental procedures for details) in U2OS cells that stably express H3.3-SNAP histones (Dunleavy et al., 2011) and a GFP-tagged version of the repair factor XPC (Xeroderma Pigmentosum C) for visualizing damage sites in live cells (see Figure S1A for a characterization of the cell line). Real-time imaging of parental H3.3 dynamics after local UVC irradiation revealed a rapid reduction of the red fluorescence associated with old H3.3, which was restricted to the damaged chromatin area marked by GFP-XPC and detectable at least for 1 hour after irradiation (Figure 1B). We observed a similar decrease of parental H3.3 signal in cells that do not express GFP-XPC (Figure 1C), thus showing that exogenous expression of this repair protein does not alter the histone response to UVC laser micro-irradiation. We ruled out the possibility that the decrease in parental H3.3 signal observed at UVC damage sites could correspond to the neo-formation of a nucleolus (Figure S1B) and could result from photo-bleaching of the red fluorescence by the UVC laser, as irradiating paraformaldehyde-fixed cells with UVC did not reduce the red signal (Figure 1C). Thus, the observed decrease in old H3.3 signal in UVC-irradiated chromatin regions truly reflects enhanced dynamics of parental H3.3 histones in response to genotoxic stress. Furthermore, when we deliberately photo-bleached the red fluorescence in the absence of DNA damage by locally illuminating living cells with a 555 nm laser, we observed an immediate loss of the red signal while UVC laser micro-irradiation led to a progressive reduction of the red fluorescence, with a maximum of 40% loss 10 minutes after DNA damage infliction (Figure 1C). These features of parental H3.3 dynamics were recapitulated by labeling pre-existing histones with a green-fluorescent SNAP reagent instead of the red one (data not shown).

To ensure that SNAP-tag-based labeling did not interfere with parental H3 dynamics in response to DNA damage, we also developed a complementary strategy to track parental histones, based on photo-activation of PA-GFP (photo-activatable GFP) 48 h before UVC laser micro-irradiation in U2OS cells engineered to stably express H3.3-PA-GFP and RFP-XPC (see Figure S1C & experimental procedures for details). In line with our previous findings, we observed a marked reduction of parental H3.3 signal in UVC-damaged chromatin regions within minutes after laser micro-irradiation in live cells and not in

paraformaldehyde-fixed cells (Figures S1D and S1E). Thus, regardless of the strategy used to monitor old histone dynamics, our data reveal a local loss of parental H3.3 histone signal in damaged chromatin regions.

Furthermore, the altered distribution of parental histones in response to UVC damage was observed in all irradiated cells, throughout interphase (Figure S1F), and was not restricted to the H3.3 variant as we observed that parental H3.1 signal was also reduced at UVC damage sites (Figure S1G).

Collectively, these results demonstrate that parental H3 histones are rapidly mobilized from UVC-damaged chromatin regions.

Conservative redistribution of parental histones to the periphery of UVC-damaged regions

We next sought to characterize the local reduction in old H3 staining in response to UVC irradiation to determine if it reflects an actual loss of parental histones from damaged chromatin, causing a loss of epigenetic information. For this, we measured changes in old H3.3 fluorescence in the entire volume of the cell nucleus after local UVC damage. To be sensitive enough, we minimized the size of the area labeled with parental histones either by photo-bleaching H3.3-SNAP-associated fluorescence in most of the nucleus or by local photo-activation of H3.3-PA-GFP (see Figures 2A, S2A & experimental procedures for details). Doing so, we could detect a 20% loss of fluorescence from the entire nucleus upon photo-bleaching inside the fluorescent patch of parental H3.3-SNAP histones (Figure 2B). In contrast, targeting UVC irradiation to the fluorescent patch of parental histones, while leading to a comparable loss of signal in the irradiated area (around 40%), did not result in a detectable loss of fluorescence in the entire nucleus (Figure 2B). From these results we conclude that the parental H3 histones mobilized early after genotoxic stress remain in the damaged nucleus and are not subject to massive degradation.

We then refined our analysis by quantifying the distribution of the old H3.3 signal around the damaged area 15 minutes post local UVC irradiation (Figures 2A and 2C). Remarkably, we observed that the depletion of fluorescence in the center of the damaged region was accompanied by an enrichment in the surrounding area, which balanced the loss (Figures 2C and 2D). Importantly, this conservative redistribution of parental histones after local UVC irradiation was not observed upon local photo-bleaching of old histone fluorescence. We obtained similar results using SNAP-tag-based and photo-activation-based tracking of parental histones (Figure S2A-S2D). Such redistribution of parental histones in response to UVC irradiation argues against a model where pre-existing H3 histones would be evicted from damaged chromatin, as, if solubilized in the nucleoplasm, they would not occupy a defined zone in the periphery of the irradiated region. Supporting this idea, detergent extraction of live cells after UVC irradiation did not alter the redistribution pattern of parental

histones, indicating that these mobilized histones were still chromatin-associated (Figure S2E).

Furthermore, parental histone redistribution in response to UVC irradiation was accompanied by an expansion of the fluorescent patch of parental histones (Figure 2B and S2B). In line with this expansion, we measured around 20% loss of DNA density in UVC-damaged chromatin regions 15 minutes after irradiation (Figure 2E, to be compared with 40% loss of old H3.3 signal).

Altogether, these data demonstrate that parental H3 histones are redistributed in a conservative-manner near the damaged area, by a process that involves damaged chromatin expansion.

The UVC damage sensor DDB2 is critical for parental histone redistribution

To characterize the molecular determinants of parental H3 redistribution to the periphery of UVC-damaged regions, we first explored the connection with UVC damage repair. We observed a dose-dependent mobilization of parental H3.3 in UVC-damaged regions (Figure 3A), based on which we decided to analyze the impact of depleting NER factors involved at different steps of UVC damage repair (Figure 3B & S3A; reviewed in (Alekseev and Coin, 2015; Marteijn et al., 2014)). Decreasing the expression of the late repair factor XPG (Xeroderma Pigmentosum G), required for excision of the damaged oligonucleotide before repair synthesis, did not markedly impair parental H3.3 redistribution upon UVC irradiation (Figure S3B). Similarly, the early repair factor ERCC6 (Excision-Repair Cross-Complementing 6), involved in damage recognition within transcribed genes, was dispensable for parental H3.3 mobilization. Consistent with this finding, we did not notice any significant defects in old H3.3 mobilization in cells treated with a transcription inhibitor prior to UVC irradiation (data not shown). These results thus indicate that the mobilization of pre-existing H3 histones in response to DNA damage is not linked to transcription-coupled repair nor to late repair steps.

By contrast, we observed that depleting the UVC damage sensor DDB2 (DNA Damage Binding protein 2), involved in global genome repair, strikingly reduced old H3.3 mobilization in response to DNA damage (Figure 3C). Similar phenotypes were observed whether the knocked-down cells express or not a tagged version of XPC (data not shown), thus ruling out the possibility that exogenous expression of this repair factor could perturb the NER-coupled dynamics of parental histones. We also confirmed the requirement for DDB2 in this response by transfecting cells with a second siRNA, targeting a distinct region in DDB2 mRNA (Figure S3C). However, we did not observe a marked defect in parental H3 mobilization in response to UVC irradiation upon down-regulation of the DDB2 partners, DDB1 and CUL4A (Cullin 4A) (Figure 3C), which altogether are part of an E3-ubiquitin ligase complex that modifies various substrates at sites of UVC damage ((Nospikel, 2011),

Figure 3B). Consistent with the minor impact of depleting DDB1 and CUL4A on parental H3 mobilization, preventing *de novo* ubiquitylation reactions taking place at damage sites by treating cells with a proteasome inhibitor did not markedly alter the redistribution of old H3.3 in damaged chromatin regions (Figure S3D). These data thus demonstrate that the ubiquitylation activity of the DDB1-DDB2-CUL4A containing complex does not play a major role in parental histone mobilization in response to UVC damage. Parental H3 redistribution to the periphery of damaged chromatin regions is thus coupled to the earliest steps of global genome NER, with a prominent role for DDB2.

To further characterize the contribution of DDB2 to old histone redistribution upon UVC irradiation, we tested the effect of DDB2 over-expression as opposed to its down-regulation. We observed that expressing an exogenous form of DDB2 significantly increased the area of parental histone redistribution in the periphery of UVC-irradiated regions 15 minutes after local UVC irradiation: this area was 50% larger in cells expressing GFP-DDB2 than in cells expressing GFP-XPC (Figure 3D). These results thus indicate that DDB2 is limiting for parental histone mobilization in UVC-irradiated chromatin regions. Furthermore, artificial tethering of DDB2 to a LacO (Lactose Operator) array in the absence of DNA damage in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP histones led to a marked reduction of parental H3.3 histone density in the LacO array (Figure 3E). These results reveal that DDB2 tethering to chromatin is sufficient for parental histone mobilization in the absence of DNA damage.

Collectively, our data put forward the early repair factor DDB2 as a master regulator of parental H3 redistribution in the periphery of UVC sites as DDB2 is necessary, limiting and sufficient for this process.

Parental H3.3 redistribution is independent of new H3.3 deposition

As we demonstrated in a previous study that the early repair factor DDB2 also controls the recruitment of the histone chaperone HIRA, which promotes the deposition of newly synthesized histones H3.3 at UVC damage sites (Adam et al., 2013), we decided to investigate the potential coupling between parental and new H3.3 dynamics in response to UVC irradiation. For this, we first characterized the relative kinetics of parental histone mobilization and new histone deposition upon local UVC damage (Figure 4A) in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP, allowing us to label parental and new histones in different colors within the same sample (see Experimental procedures for details). Parental histones H3.3 are displaced within minutes after damage induction, as described earlier, whereas new histone H3.3 accumulation at damage sites becomes detectable only 45 minutes after local UVC irradiation. We obtained similar results when we swapped the SNAP reagents, labeling old H3.3 in green and new H3.3 in red (data not shown). Thus, parental histone displacement precedes new histone deposition at UVC damage sites.

Given that the H3.3 histone chaperone HIRA promotes the deposition of newly synthesized H3.3 at UVC damage sites (Adam et al., 2013), we next tested whether the same chaperone was also responsible for parental H3.3 mobilization in UVC-damaged regions. Interestingly, HIRA depletion did not impair old H3.3 signal loss at UVC sites (Figure 4B), showing that this histone chaperone does not participate in parental H3.3 redistribution after UVC irradiation. These findings indicate that parental H3.3 mobilization occurs independently of new H3.3 deposition. Consistent with this, preventing synthesis of new histones H3.3 by siRNA did not interfere with parental H3.3 displacement from UVC damaged regions (Figure 4C; note that this treatment did not affect pre-existing histone H3.3 levels because histones are very stable proteins). This experiment thus confirms that newly synthesized histone H3.3 dynamics have no impact on parental H3.3 mobilization in the periphery of DNA damage. Altogether, these data demonstrate that parental histone H3.3 dynamics are functionally independent of new H3.3 deposition at UVC damage sites.

Recovery of parental histones coupled to repair progression through DDB2 release

Because parental histones are kept in the periphery of UVC-damaged regions early after DNA damage, we decided to investigate whether and to which extent they contribute to chromatin restoration long-term after damage. For this purpose, we examined both parental and new H3.3 dynamics in parallel with repair progression at late time points after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and CFP-XPC (see Figure S4A for a characterization of the cell line). This revealed a 80% recovery of parental H3.3 histones at UVC damaged sites within 9 to 12 hours after irradiation (Figure 5A). In contrast, only 20% of parental H3.3 histones were mobile in undamaged chromatin within the same time frame (Figure S4B), consistent with a previous report (Kimura and Cook, 2001), arguing that parental H3.3 recovery in damaged chromatin does not result from basal histone turnover but actually reflects enhanced dynamics of parental histones in UVC-damaged regions. Similar results were obtained when we performed the experiment in the presence of an excess of non-fluorescent SNAP reagent to make sure that only parental histones were labeled in red (data not shown). Parental histone recovery at UVC damage sites was also recapitulated in U2OS cells stably expressing H3.3-PA-GFP (Figure S4C). Importantly, new histones deposited in damaged chromatin persisted while parental histones recovered (Figure 5A). Thus, our data establish that, long term after UVC irradiation, most parental histones recover and mix with newly synthesized histones in damaged chromatin.

We next sought to determine if parental H3.3 recovery in damaged chromatin was coupled to repair progression. For this, we depleted the late repair factor XPG, which interferes with repair progression with no major effect on the early mobilization of parental histones from damaged chromatin as shown above (Figure S3). Parental H3.3 recovery however was markedly impaired in XPG-depleted cells, reaching only 20% 9 hours after local UVC

irradiation (Figure 5B). These results indicate that parental histone recovery in damaged chromatin is dependent on repair progression. Given that XPG depletion also significantly delayed DDB2 release from chromatin, we decided to assess more directly the role of DDB2 in parental histone recovery. For this, we triggered LacR-DDB2 release from the LacO array by adding IPTG to the culture medium (Figure 5C). We found that DDB2 release from chromatin resulted in rapid recovery of old H3.3 density at the LacO array, which highlights the key role of DDB2 in controlling parental histone dynamics in UVC-damaged chromatin. Collectively, our results demonstrate the major contribution of parental histones to chromatin restoration coupled to repair and establish that parental histone recovery is coordinated with repair progression through DDB2 release from damaged chromatin.

DISCUSSION

By exploiting real-time tracking of parental H3 histones after local UVC damage in human cells, we provide novel insights into epigenome maintenance in response to DNA damage. Our study indeed identifies a conservative pathway, tightly coordinated with repair progression, whereby pre-existing histones are rapidly redistributed around UVC-damaged chromatin and subsequently recover (Figure 5D). We propose that the original information conveyed by parental histones is thus kept in the periphery of the damaged areas in order to be restored after DNA repair, contributing to build a memory of chromatin identity in response to DNA damage.

Parental histone mobilization away from damaged chromatin regions

Chromatin disorganization coupled to the early stages of the DDR, although considered to be critical for efficient DNA repair, has remained essentially an uncharacterized process. Here, we provide evidence for a conservative redistribution of parental histones near damaged chromatin regions. Our findings thus argue against the commonly held view that histones are evicted from damaged chromatin to facilitate repair, prompting us to propose a revised version of the “Access-Repair-Restore” model. Even though histone solubilization has been reported in response to genotoxic stress (Goldstein et al., 2013; Wang et al., 2006; Xu et al., 2010), our data support a model where pre-existing histones are mobilized away from damaged chromatin regions mostly by nucleosome sliding and/or chromatin opening. Furthermore, whether this directly facilitates access to damaged DNA and repair progression is not entirely clear. Indeed, in conditions where ubiquitylation at damage sites is abrogated, the recruitment of the early NER factor XPC is impaired (Marteijn et al., 2014; Nospikel, 2011) but parental histone mobilization is not. These findings argue that mobilizing parental histones is not sufficient for promoting the recruitment of NER factors to damaged chromatin. Keeping parental histones near the damaged region may favor the reorganization of chromatin

after repair. It might also contribute to protect parental histones from modifications by enzymes recruited to regions of ongoing repair, thus promoting the maintenance of the original information. It will be of major interest to test this model further by investigating the functional relevance of parental histone mobilization in damaged chromatin.

The extent of chromatin rearrangements in response to local DNA damage infliction is another matter of debate. Although one study indicates that chromatin destabilization affects the whole nucleus upon local UVC irradiation (Rubbi and Milner, 2003), several lines of evidence rather support the idea that chromatin is locally disorganized upon genotoxic stress (Dinant et al., 2013; Goldstein et al., 2013; Hinde et al., 2014; Kruhlak et al., 2006; Luijsterburg et al., 2012; Smeenk et al., 2013). In line with this, here, we demonstrate that parental histones are redistributed to the periphery of the UVC damaged area. It will be important to investigate the existence of structural barriers that would restrict the spreading of chromatin destabilization in response to DNA damage similar to boundary elements between chromatin domains. Furthermore, the extent of chromatin disorganization after DNA damage may be different in highly transcribed euchromatin regions compared to mostly silent heterochromatin, and is also likely to differ depending on the type of DNA lesion and repair pathway at work. It will thus be interesting to explore in future studies how the original chromatin state and the nature of the damage impact repair-coupled histone dynamics.

Regarding the mechanisms underlying chromatin disorganization in response to DNA damage, we have identified the damage sensor DDB2 as a master regulator of parental histone mobilization at sites of UVC lesions. Interestingly, while the ubiquitylation activity of DDB2-containing complex is required for new histone deposition in UVC-damaged chromatin (Adam et al., 2013), it is dispensable for parental histone dynamics coupled to UVC lesion recognition. Consistent with our findings, ubiquitylation-deficient mutants of DDB2 induce chromatin expansion like wild-type DDB2 when artificially tethered to chromatin in absence of DNA damage (Luijsterburg et al., 2012). Thus, DDB2-mediated parental histone mobilization and chromatin expansion at UVC damage sites is largely independent of the other members of the UVC damage recognition complex. Whether DDB2 acts alone or in association with other factors to fulfill this activity will be interesting to investigate in future studies. Remarkably, DDB2 has very strong affinity for UVC-damaged DNA (Kulaksiz et al., 2005; Wittschieben et al., 2005) which might be sufficient for moving nucleosomes away from damaged areas. However, structural studies have revealed that DDB2 binding to damaged DNA is still compatible with DNA wrapping around histone proteins within nucleosomes (Scrima et al., 2008; Yeh et al., 2012), suggesting that DDB2 binding might not be enough to promote nucleosome sliding. Given that the DDB2 protein does not display any ATPase/helicase nor histone binding domains, we rather favor a model where DDB2 works in concert with other factors directly involved in chromatin dynamics – such as histone

chaperones and/or chromatin remodeling complexes that remain to be identified – to promote chromatin disorganization in damaged regions.

Epigenome maintenance after DNA damage

Our study identifies a critical pathway that contributes to preserving the integrity of chromatin architecture in response to DNA damage. We unraveled that damaged chromatin reorganization is a two-step process with new histone incorporation preceding parental histone recovery in damaged chromatin regions. The biphasic nature of chromatin restoration is consistent with an early model based on the accessibility to nucleases of chromatin undergoing NER (reviewed in (Smerdon, 1991)).

Our findings have also broad implications for understanding how a memory of the initial epigenome is preserved in response to genotoxic stress. Indeed, we provide evidence that most parental histones recover and mix with newly synthesized histones in repairing chromatin. If newly synthesized histones persist in the repaired chromatin, how parental marks are transferred to the new histones that initially carry their own set of post-translational modifications (PTMs) (Loyola et al., 2006) is an open question. In this respect, a parallel can be drawn between the restoration of damaged chromatin and the reorganization of replicated chromatin, in which parental histones are recycled and new histones are deposited (Alabert and Groth, 2012; MacAlpine and Almouzni, 2013). However, while cells have to cope with 50% histone renewal during replication, most parental histones recover in damaged chromatin regions, which could facilitate the re-establishment of the original chromatin landscape. Following DNA replication, the maintenance of chromatin identity is achieved by old histone recycling with their PTMs at the replication fork and by subsequent modifications of new histones to mirror the parental ones (Alabert et al., 2015). Whether similar mechanisms operate in damaged chromatin and whether parental and new histones are mixed together in a same nucleosome to facilitate old PTM transmission to newly deposited histones will be addressed in future studies.

Finally, our data open up new avenues for understanding the etiology of several human diseases including H3 mutant-associated cancers (reviewed in (Kallappagoudar et al., 2015; Yuen and Knoepfler, 2013)) and NER disorders (reviewed in (DiGiovanna and Kraemer, 2012; Marteiijn et al., 2014)). Given that DDB2 dynamics strongly impact the fate of parental histones in response to UVC damage, it will be important to consider that the phenotype of XPE patients harboring DDB2 mutations may not only reflect a DNA repair deficiency but could also be a consequence of altered chromatin plasticity in response to genotoxic stress. Similarly, H3 mutations could contribute to the development of human cancers by affecting the resetting of the epigenome in response to DNA damage.

In conclusion, our work sheds new light to our current view of DNA damage-induced chromatin rearrangements, with parental histone dynamics playing a major role in the maintenance of epigenome integrity in response to genotoxic stress. Our findings also pave the way for the identification of new factors that contribute to restoring damaged chromatin identity, thus protecting cells against pathological conditions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture and drug treatments

All U2OS cell lines were grown at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (EUROBIO), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen) and the appropriate selection antibiotics (Table S1).

DNA was stained by incubating live cells with Hoechst 33258 (10 µg/mL final concentration, Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C before the analysis. Detergent extraction on live cells was performed as described in the immunofluorescence section of the Supplemental experimental procedures. Proteasome inhibition was performed by adding MG132 to the culture medium for 2 h at 37°C before the analysis (10 µM final concentration, Enzo Life Science). LacR-DDB2 release from the Lac operator was achieved by adding IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, 10 µM final concentration, Euromedex) to the culture medium in which the usual serum is replaced by Tetracycline-free fetal calf serum (Biowest). For long-term experiments on live cells, Hepes buffer was added to the culture medium (25 mM final concentration, Sigma-Aldrich).

SNAP labeling and photo-activation of histones

Pre-existing SNAP-tagged histones were labeled by incubating cells with 2 µM SNAP-cell TMR star (New England Biolabs) for 20 min (pulse), followed by a 30 min-incubation in fresh medium. Cells were subject to laser micro-irradiation 48 h after the pulse.

For specific labeling of newly-synthesized histones, pre-existing SNAP-tagged histones were first quenched by incubating cells with 10 µM SNAP-cell Block (New England Biolabs) for 30 min followed by a 30 min-wash in fresh medium and a 2 h-chase. The SNAP-tagged histones neo-synthesized during the chase were then pulse-labeled with 4 µM SNAP-cell Oregon Green (New England Biolabs) for 20 min followed by a 30 min-incubation in fresh medium. Cells were subject to local UVC irradiation immediately afterwards.

Photo-activation experiments were performed in U2OS cells stably expressing H3.3-PA-GFP on a Zeiss LSM710 confocal microscope using the 405 nm laser focused through a LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 oil objective (laser settings: maximum power, 5 iterations, 6.30 µsec/pixel scan speed). We photo-activated either total nuclei 48 h prior to local UVC

irradiation or a nuclear region of $20 \mu\text{m}^2$ 8 to 10 h before local UVC irradiation to minimize the distortion of the photo-activated area due to cell movement and cell division.

FRAP

Bleaching of the red fluorescence was performed with a 555 nm laser (laser settings: maximum power, 4 iterations, 1.58 $\mu\text{sec}/\text{pixel}$ scan speed). Bleaching of the green fluorescence was performed using a 488 nm laser (laser settings: maximum power, 15 iterations, 6.30 $\mu\text{sec}/\text{pixel}$ scan speed). In both cases, the laser was focused through a LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 multi-immersion objective, the bleached area was 2 μm in diameter and bleaching conditions were set to reach a local loss of fluorescence similar to the loss of signal observed 15 min after UVC laser damage. For bleaching of the red fluorescence in the entire nucleus to leave a small fluorescent patch of $20 \mu\text{m}^2$, the laser settings were changed to 10 iterations and 12.61 $\mu\text{sec}/\text{pixel}$ scan speed.

siRNA and plasmid transfections

siRNAs purchased from Eurofins MWG Operon (Table S2) were transfected into cells using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) following manufacturer's instructions. The final concentration of each siRNA in the culture medium was 50 nM. Cells were analyzed and/or harvested 72 h post-transfection. When performing over-night experiments with mixed cell populations treated with different siRNAs, one of the two cell populations was stained with Cell Tracker Deep Red (Life Technologies) following manufacturer's instructions.

Cells were transiently transfected with plasmid DNA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions 48 h before subsequent cell treatment. For stable cell line establishment, cells were transfected with plasmid DNA as above 48 h before antibiotic selection of clones. All constructs were verified by direct sequencing and/or restriction digests. Cloning details and primer sequences (Sigma-Aldrich) are available upon request. Plasmids are described in Table S3.

UVC laser micro-irradiation

For laser-induction of UVC damage (Dinant et al., 2007), cells were grown on quartz coverslips (SPI supplies) and irradiated for 50 ms unless stated otherwise using a 2 mW pulsed diode-pumped solid-state laser emitting at 266 nm (repetition rate up to 10 kHz, Rapp OptoElectronics, Hamburg GmbH). The laser was attenuated using a neutral density filter OD1 and focused through a 40x/0.6 Ultrafluar glycerol objective. In these conditions, UVC laser damage did not cause major cytotoxicity as the mortality rate over a 14 h live cell imaging experiment after laser damage was only around 10% and damaged cells did repair and went through mitosis.

Cell extracts and western blot

Total extracts were obtained by scraping cells in Laemmli buffer (50 mM Tris HCl pH 6.8, 1.6% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 8% glycerol, 4% β -mercaptoethanol, 0.0025% bromophenol blue) followed by 5 min denaturation at 95°C. For western blot analysis, extracts were run on 4%–20% Mini-PROTEAN TGX gels (Bio-Rad) in running buffer (200 mM glycine, 25 mM Tris, 0.1% SDS) and transferred onto nitrocellulose membranes (Protran) with a Trans-Blot SD semidry transfer cell (Bio-Rad). Total proteins were revealed by reversible protein stain (Pierce). Proteins of interest were probed using the appropriate primary and HRP (Horse Radish Peroxidase)-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunoresearch), detected using Super-Signal West Pico or Femto chemiluminescence substrates (Pierce) (see Table S4 for the list of antibodies).

Quantitative RT-PCR

RNA extracted from cells with Trizol (Invitrogen) and precipitated in isopropanol was subject to DNA digestion with Turbo DNA-free (Life technologies) and reverse transcribed with Superscript III RT using random primers (Life technologies). Quantitative PCR reactions were carried out with the indicated primer pairs (Table S5) and the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) and read in 96-well plates (MicroAmp® Fast Optical, Life Technologies) using a ABI 7500 Fast detection system (Life Technologies). Results were normalized to the amount of the GAPDH gene product.

Image acquisition and analysis

Live cell imaging of LacR-DDB2 dynamics was performed on a Zeiss LSM710 confocal microscope using a Plan-Apochromat 63x/1.4 oil objective. Live cell imaging coupled to local UVC irradiation was performed using a LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 multi-immersion objective on a Zeiss LSM 700 confocal microscope adapted for UVC transmission with all-quartz optics. The fluorescence-based autofocus mode was activated in order to acquire images from the best focal plane. Image J software was used for image analysis. To correct for overall bleaching of the signal due to repetitive imaging, fluorescence intensities were normalized against intensities measured in an undamaged nucleus in the same field. The extent of fluorescence loss at irradiated sites was determined by dividing the fluorescence intensity in the illuminated area by the fluorescence intensity of the entire nucleus, after background subtraction. The illuminated area was defined at 10-15 min post irradiation, based on fluorescently-labeled XPC or based on fluorescence loss, and was kept the same for all time points. Fluorescence recovery in the illuminated region was calculated relative to before illumination and starting from the time point with minimum intensity. 2D projections of 3D images from z-stack acquisitions were obtained by maximum intensity z-projection. On these projections, fluorescence intensity was measured in the micro-irradiated zone, in the entire

nucleus and in concentric regions spaced by 1 pixel and centered on the laser micro-irradiation site using a custom macro.

Statistical analysis

p-values from at least two independent experiments were calculated with a student t-test, including Welch's correction when necessary, using R software.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.A. and J.D. contributed equally to this work. S.A., J.D. and S.E.P designed and performed experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. O.C. provided technical assistance. O.L. and O.R. helped with UVC laser micro-irradiation and computational analyses of imaging data. S.E.P and G.A. supervised the project.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank N. Dantuma, E. Dunleavy, J. Lippincott-Schwartz and R. Nishi for sharing reagents. We thank C. Baldeyron who transferred the UVC micro-irradiation technology at the Institut Curie. We acknowledge the ImagoSeine imaging Facility (Paris Diderot University) for assistance with confocal microscopy. This work was supported by the European Research Council (ERC starting grant ERC-2013-StG-336427 "EpIn"), the French National Research Agency (ANR-12-JSV6-0002-01), the "Who am I?" laboratory of excellence (ANR-11-LABX-0071) funded by the French Government through its "Investments for the Future" program (ANR-11-IDEX-0005-01), EDF Radiobiology program RB 2014-01 and the Fondation ARC. Research in GA laboratory is supported by la Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue), the European Commission Network of Excellence EpiGeneSys (HEALTH-F4-2010-257082), ERC Advanced Grant 2009-AdG_20090506 "Eccentric", the European Commission large-scale integrating project FP7_HEALTH-2010-259743 "MODHEP", ANR "ChromaTin" ANR-10-BLAN-1326-03, ANR-11-LABX-0044_DEEP and ANR-10-IDEX-0001-02 PSL*, ANR "CHAPINHIB" ANR-12-BSV5-0022-02 and Aviesan-ITMO cancer project "Epigenomics of breast cancer". S.A. is the recipient of a PhD fellowship from University Pierre et Marie Curie and La Ligue contre le Cancer. J.D. is the recipient of a PhD fellowship from University Paris Diderot.

REFERENCES

Adam, S., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2013). Transcription Recovery after DNA Damage Requires Chromatin Priming by the H3.3 Histone Chaperone HIRA. *Cell* 155, 94–106.

Alabert, C., and Groth, A. (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 153–167.

Alabert, C., Barth, T.K., Reverón-Gómez, N., Sidoli, S., Schmidt, A., Jensen, O.N., Imhof, A., and Groth, A. (2015). Two distinct modes for propagation of histone PTMs across the cell cycle. *Genes Dev.* *29*, 585–590.

Alekseev, S., and Coin, F. (2015). Orchestral maneuvers at the damaged sites in nucleotide excision repair. *Cell. Mol. Life Sci.* doi : 10.1007/s00018-015-1859-5.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* *21*, 381–395.

Ciccica, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell* *40*, 179–204.

DiGiovanna, J.J., and Kraemer, K.H. (2012). Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 785–796.

Dinant, C., Ampatziadis-Michailidis, G., Lans, H., Tresini, M., Lagarou, A., Grosbart, M., Theil, A.F., van Cappellen, W.A., Kimura, H., Bartek, J., et al. (2013). Enhanced chromatin dynamics by FACT promotes transcriptional restart after UV-induced DNA damage. *Molecular Cell* *51*, 469–479.

Dinant, C., de Jager, M., Essers, J., van Cappellen, W.A., Kanaar, R., Houtsmuller, A.B., and Vermeulen, W. (2007). Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods. *Journal of Cell Science* *120*, 2731–2740.

Dunleavy, E.M., Almouzni, G., and Karpen, G.H. (2011). H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G1 phase. *Nucleus* *2*, 146–157.

Goldstein, M., Derheimer, F.A., Tait-Mulder, J., and Kastan, M.B. (2013). Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 16874–16879.

Green, C.M., and Almouzni, G. (2002). When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* *3*, 28–33.

Hinde, E., Kong, X., Yokomori, K., and Gratton, E. (2014). Chromatin Dynamics during DNA Repair Revealed by Pair Correlation Analysis of Molecular Flow in the Nucleus. *Biophys. J.* *107*, 55–65.

Hoeijmakers, J.H.J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* *361*, 1475–1485.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071–1078.

Kallappagoudar, S., Yadav, R.K., Lowe, B.R., and Partridge, J.F. (2015). Histone H3 mutations-a special role for H3.3 in tumorigenesis? *Chromosoma*. doi: 10.1007/s00412-015-0510-4.

Kimura, H., and Cook, P.R. (2001). Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J. Cell Biol.* *153*, 1341–1353.

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

Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., and Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* *172*, 823–834.

Kulaksiz, G., Reardon, J.T., and Sancar, A. (2005). Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. *Molecular and Cellular Biology* *25*, 9784–9792.

Lan, L., Nakajima, S., Kapetanaki, M.G., Hsieh, C.L., Fagerburg, M., Thickman, K., Rodriguez-Collazo, P., Leuba, S.H., Levine, A.S., and Rapić-Otrin, V. (2012). Monoubiquitinated histone H2A destabilizes photolesion-containing nucleosomes with concomitant release of UV-damaged DNA-binding protein E3 ligase. *J. Biol. Chem.* *287*, 12036–12049.

Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A., and Almouzni, G. (2006). PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Molecular Cell* *24*, 309–316.

Luijsterburg, M.S., Lindh, M., Acs, K., Vrouwe, M.G., Pines, A., van Attikum, H., Mullenders, L.H., and Dantuma, N.P. (2012). DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J. Cell Biol.* *197*, 267–281.

MacAlpine, D.M., and Almouzni, G. (2013). Chromatin and DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*, a010207.

Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H.J. (2014). Understanding

nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 465–481.

Maze, I., Noh, K.-M., Soshnev, A.A., and Allis, C.D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 259–271.

Nouspikel, T. (2011). Multiple roles of ubiquitination in the control of nucleotide excision repair. *Mech. Ageing Dev.* *132*, 355–365.

Polo, S.E., Roche, D., and Almouzni, G. (2006). New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* *127*, 481–493.

Probst, A.V., Dunleavy, E., and Almouzni, G. (2009). Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 192–206.

Rubbi, C.P., and Milner, J. (2003). p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J.* *22*, 975–986.

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

Smeenk, G., Wiegant, W.W., Marteiijn, J.A., Luijsterburg, M.S., Sroczynski, N., Costelloe, T., Romeijn, R.J., Pastink, A., Mailand, N., Vermeulen, W., et al. (2013). Poly(ADP-ribosylation) links the chromatin remodeler SMARCA5/SNF2H to RNF168-dependent DNA damage signaling. *Journal of Cell Science* *126*, 889–903.

Smerdon, M.J. (1991). DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* *3*, 422–428.

Soria, G., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2012). Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Molecular Cell* *46*, 722–734.

Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 264–275.

Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.-Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Molecular Cell* *22*, 383–394.

Wittschieben, B.Ø., Iwai, S., and 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.

Xu, Y., Sun, Y., Jiang, X., Ayrapetov, M.K., Moskwa, P., Yang, S., Weinstock, D.M., and Price, B.D. (2010). The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. *J. Cell Biol.* *191*, 31–43.

Yeh, J.I., Levine, A.S., Du, S., Chinte, U., Ghodke, H., Wang, H., Shi, H., Hsieh, C.L., Conway, J.F., Van Houten, B., et al. (2012). Damaged DNA induced UV-damaged DNA-binding protein (UV-DDB) dimerization and its roles in chromatinized DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, E2737–E2746.

Yuen, B.T.K., and Knoepfler, P.S. (2013). Histone H3.3 mutations: a variant path to cancer. *Cancer Cell* *24*, 567–574.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Rapid mobilization of parental H3 histones from UVC-damaged chromatin regions.

(A) Current model for histone dynamics in UVC-damaged chromatin (left): the incorporation of new histones (green) raises questions about the fate of parental histones (red). The experimental strategy for tracking parental histone dynamics at DNA damage sites (right) combines SNAP-tag labeling of parental histones with local UVC damage by laser micro-irradiation and live cell imaging.

(B) Distribution of parental histones H3.3 (red) at the indicated time points after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-XPC (repair factor).

(C) Dynamics of parental histones H3.3 (red) at early time points after local damage with the UVC laser or local bleaching of the red fluorescence with a 555 nm laser in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP. UVC laser micro-irradiation was also applied to paraformaldehyde-fixed cells to control for photo-bleaching of the red fluorescence by the UVC laser. White arrowheads indicate the illuminated areas. Scale bars, 10 μm . The graphs show quantifications of the red fluorescence associated with parental H3.3 in illuminated areas, normalized to the red fluorescence in the same areas before laser micro-irradiation. Error bars represent SD from n cells scored in two independent experiments.

See also Figure S1.

Figure 2: Conservative redistribution of parental histones to the periphery of UVC-damaged regions.

(A) Experimental procedure for measuring parental histone loss and redistribution around the UVC damaged zone. A region of interest is defined by photo-bleaching of the red fluorescence associated with parental H3.3-SNAP histones leaving a small fluorescent patch in the nucleus, which is subjected to micro-irradiation with a 266 nm UVC laser (damage induction) or with a 555 nm bleaching laser (control). Fluorescence measurements are performed in the indicated regions on 2D projections of 3D acquisitions.

(B) Fluorescent patches of parental histones H3.3 (red) before and 15 min after local UVC damage (left) or local photo-bleaching (right) in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-XPC. Red dotted lines delineate the cell nuclei. The edges of the fluorescent patches of parental histones before and 15 min after local irradiation are shown in white on the zoomed images. The boxplots show quantification of the red fluorescence associated with parental H3.3-SNAP histones in the entire nucleus (left) or in the illuminated region (right) at 15 min normalized to before illumination (dotted line). n: number of cells

(C) Quantification of the red fluorescence associated with parental H3.3-SNAP histones in concentric regions around the UVC damage site (purple) or the site of fluorescence bleaching with the 555 nm laser (red) at the indicated time points.

(D) Difference in red fluorescence distribution between the two time points obtained by subtracting 0 min from 15 min values quantified in (C). The position of the repair zone is based on GFP-XPC accumulation at 15 min. Error bars represent SD from n cells scored in two independent experiments.

(E) Distribution of parental histones H3.3 (red) and DNA (blue, stained with Hoechst) 15 min after local UVC irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP. Paraformaldehyde-fixed cells were used as a control for photo-bleaching of Hoechst staining by the UVC laser. White arrowheads indicate the irradiated areas. The graphs show quantifications of fluorescence loss in irradiated areas (red fluorescence associated with parental H3.3 and blue fluorescence associated with DNA; data from n cells scored in two independent experiments).

Scale bars, 10 μ m.

See also Figure S2.

Figure 3: Parental histone redistribution is controlled by the repair factor DDB2

(A) Distribution of parental histones H3.3 15 min after UVC laser micro-irradiation at increasing UVC doses (exposure times to UVC are indicated) in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-XPC.

(B) Scheme of the main repair factors involved in UVC damage detection in the global genome NER pathway.

(C) Distribution of parental histones H3.3 (red) 15 min after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-XPC treated with the indicated siRNAs (siLUC: control). siRNA efficiencies were verified by western-blot (right). The boxplots show quantifications of red fluorescence loss in irradiated areas at 15 min compared to before laser micro-irradiation (data from n cells scored in two independent experiments).

(D) Distribution of parental histones H3.3 (red) 15 min after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-XPC or GFP-DDB2. Expression levels of exogenous XPC and DDB2 relative to the endogenous proteins are shown on the western-blot panel (right). The boxplots show quantifications of red fluorescence loss in irradiated areas at 15 min compared to before laser micro-irradiation and of the area of fluorescence loss marked by GFP-tagged NER factors.

(E) Distribution of parental histones H3.3 (green) upon tethering of mCherry-LacR (-) or mCherry-LacR-DDB2 (DDB2) to the LacO array in U2OS LacO cells stably expressing H3.3-SNAP as depicted on the scheme (left). Quantifications of the area of the LacO array and the green fluorescence at the LacO array are displayed on the boxplots, which represent data from n cells scored in two independent experiments. White arrowheads indicate the irradiated areas or the position of the LacO array. Scale bars, 10 μ m.

See also Figure S3.

Figure 4: Parental H3.3 redistribution is independent of new H3.3 deposition.

(A) Dynamics of parental (red) and newly synthesized (green) histones H3.3 at the indicated time points after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP. The graph shows quantifications of red and green fluorescence in irradiated areas, normalized to before laser micro-irradiation. Error bars represent SD from n cells scored in two independent experiments.

(B) Distribution of parental histones H3.3 (red) 15 min after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-XPC treated with the indicated siRNAs (siLUC: control). siRNA efficiency was verified by western-blot (bottom).

(C) Distribution of parental (red) and newly synthesized (green) histones H3.3 at the indicated time points after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP treated with the indicated siRNAs (siLUC: control). siRNA efficiency was verified by quantitative RT-PCR (right). The boxplots show quantification of red fluorescence loss in irradiated areas at 15 min compared to before laser micro-irradiation (data from n cells scored in two independent experiments). White arrowheads indicate the irradiated areas. Scale bars, 10 μ m.

Figure 5: Recovery of parental histones coupled to repair progression

(A) Dynamics of parental (red) and newly synthesized histones H3.3 (green) at the indicated time points after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and CFP-XPC (blue). The graph shows quantification of red fluorescence recovery in irradiated areas. Cells that did not repair efficiently (based on CFP-XPC retention) were excluded from the analysis. Error bars represent SD from n cells scored in two independent experiments.

(B) Dynamics of parental histones H3.3 (red) at the indicated time points after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-DDB2 treated with the indicated siRNAs (siLUC: control). The efficiency of XPG depletion is indicated by sustained retention of GFP-DDB2 at UV sites. The graphs show quantification of red fluorescence recovery in irradiated areas. Error bars represent SD from n cells scored in two independent experiments.

(C) Distribution of parental H3.3 (green) upon IPTG-mediated release of mCherry-LacR-DDB2 from the LacO array in U2OS LacO cells stably expressing H3.3-SNAP. The graphs show quantifications of the green fluorescence at the LacO array and of the LacR-DDB2 area (red) after IPTG addition. Error bars represent SD from n cells scored in two independent experiments. White arrowheads indicate the irradiated areas or the position of the LacO array. Scale bars, 10 μm .

(D) Model for parental histone dynamics in UVC-damaged chromatin regions.

See also Figure S4.

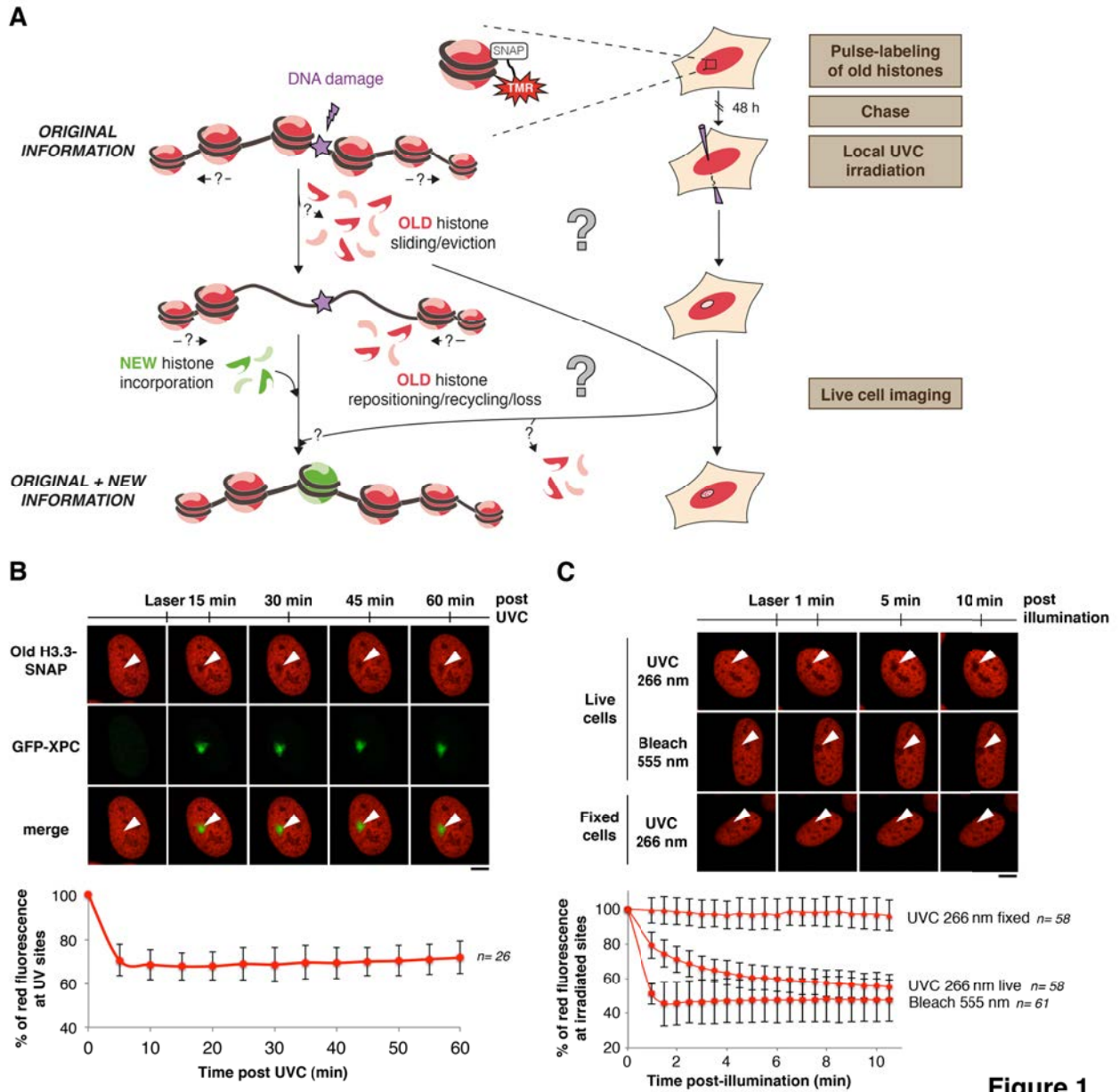


Figure 1

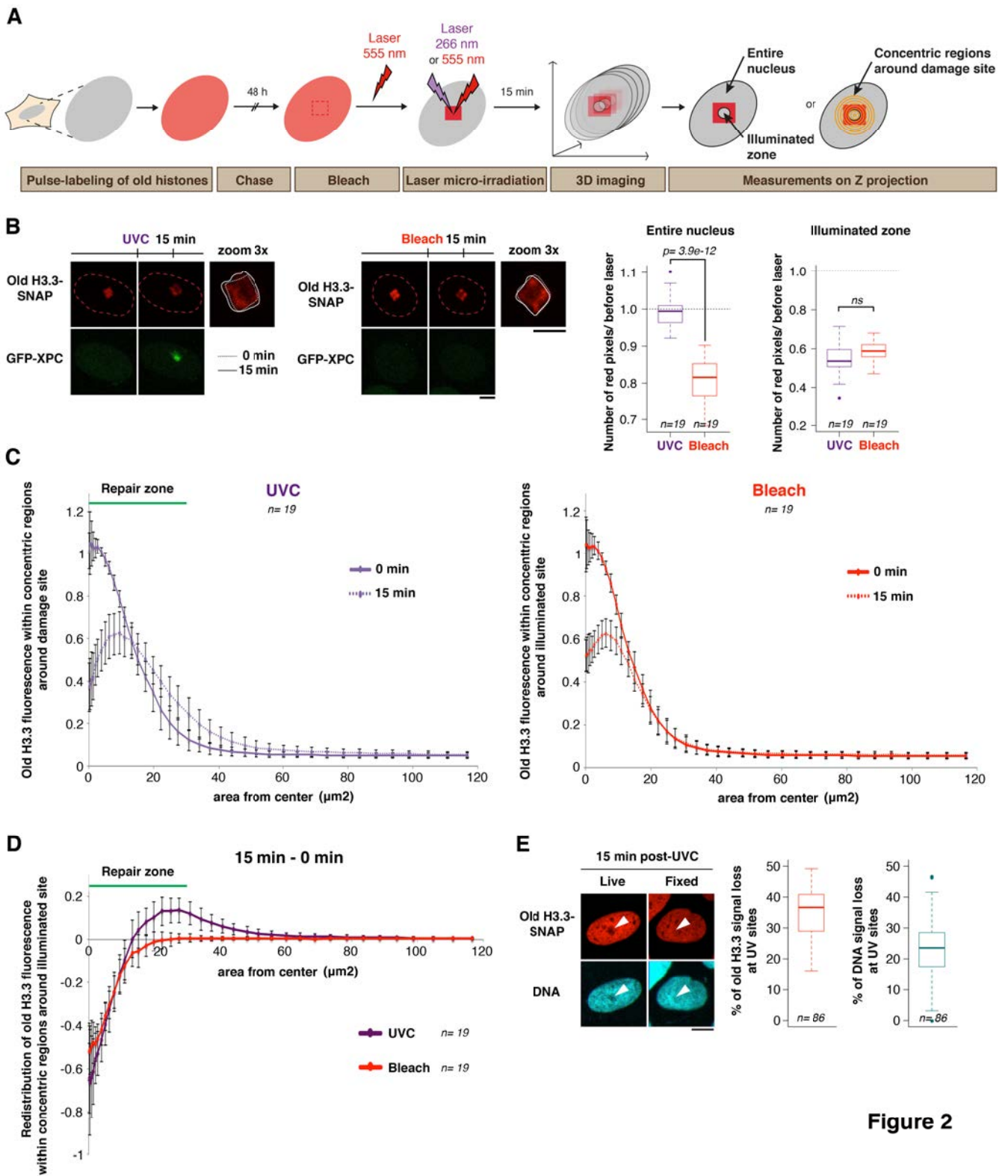


Figure 2

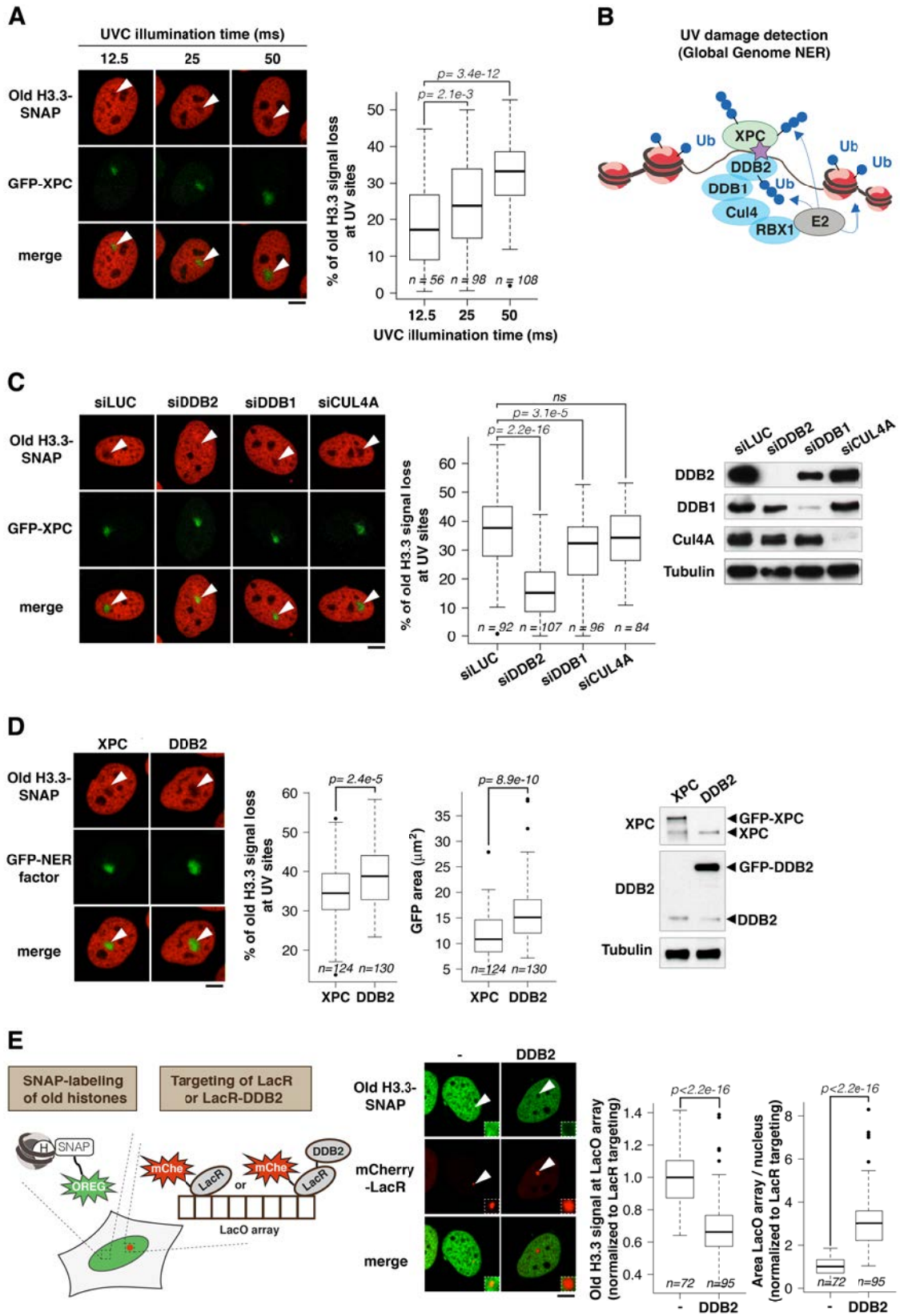


Figure 3

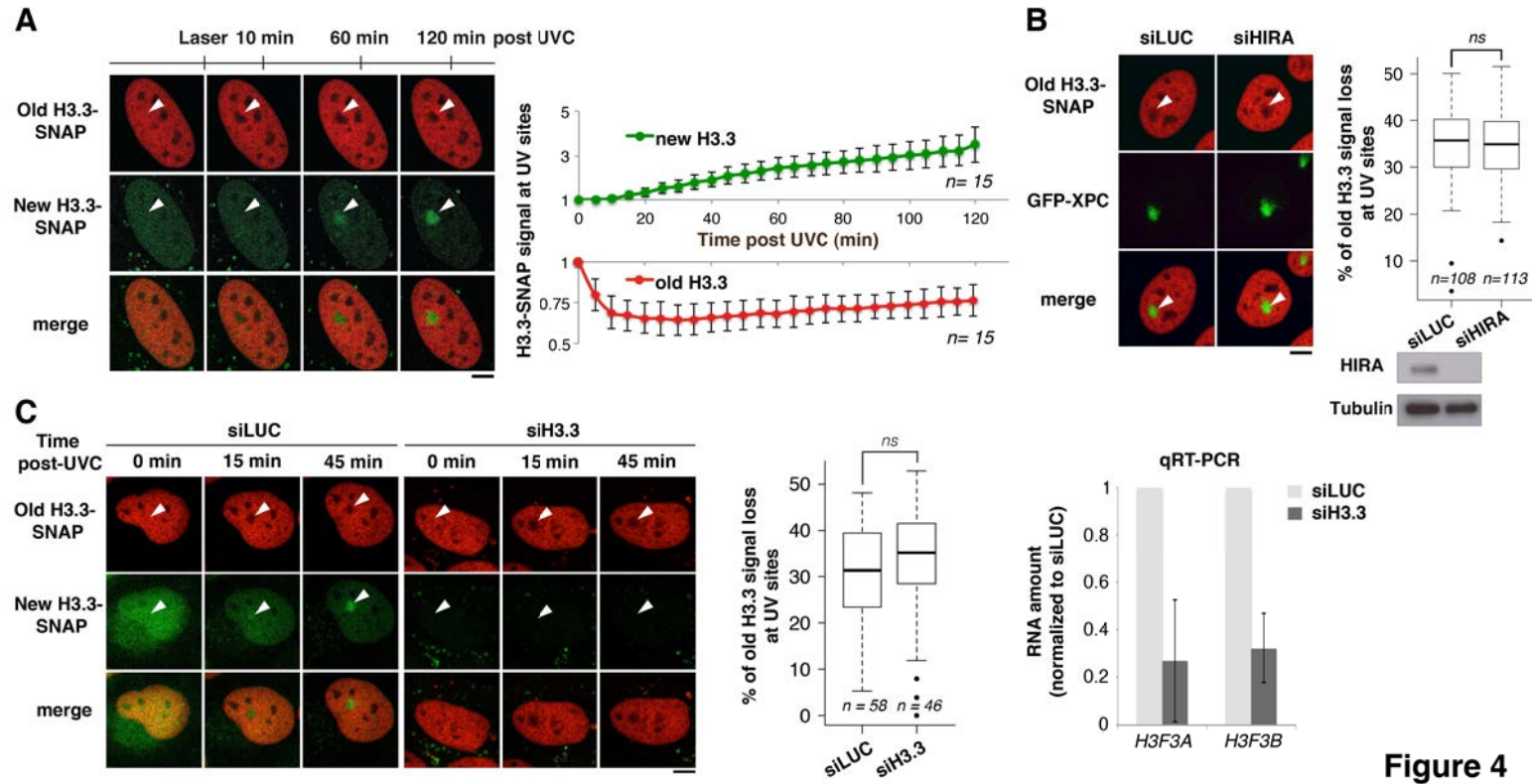


Figure 4

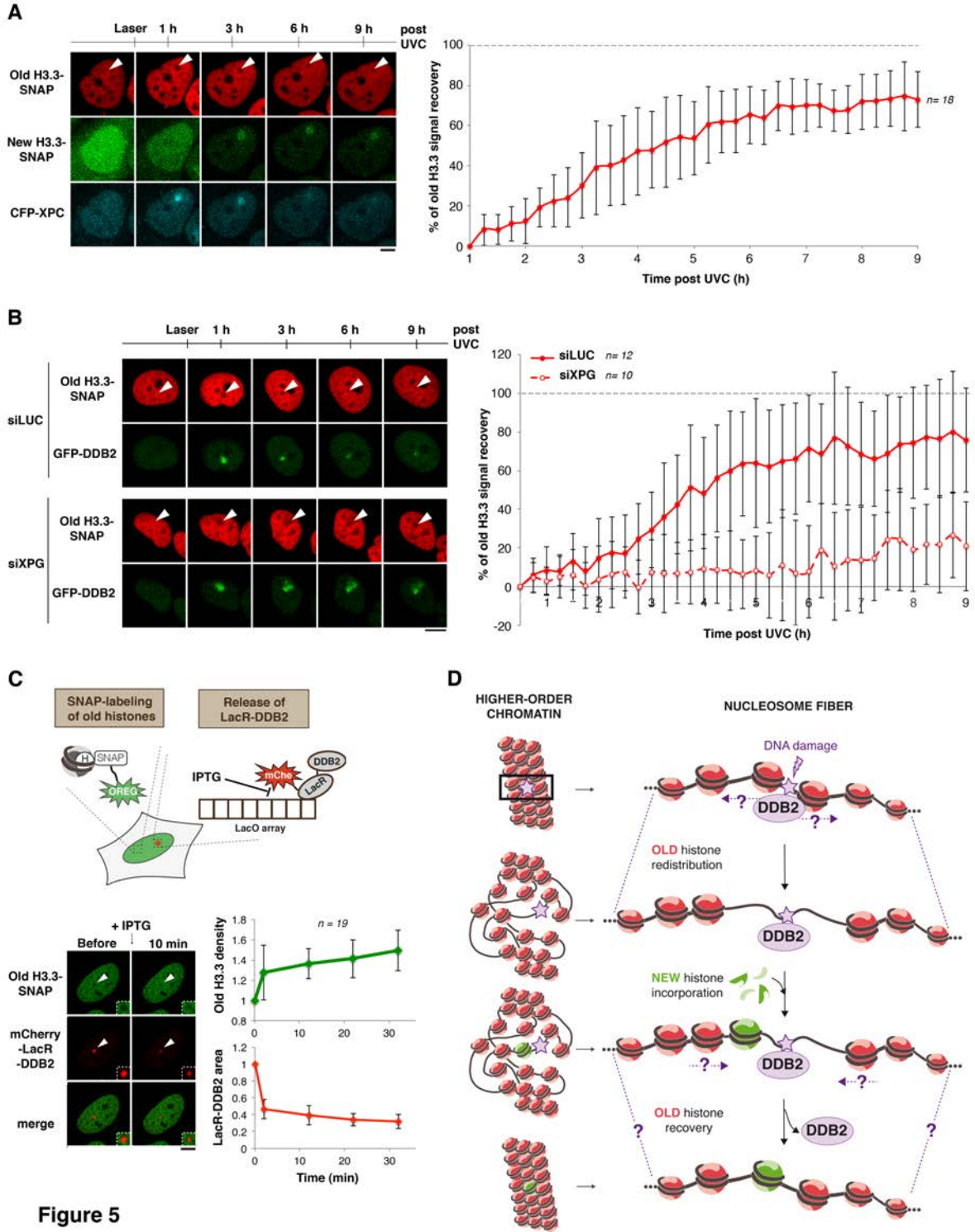


Figure 5

Supplemental Information

EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

Local UVC irradiation (Katsumi et al., 2001; Moné et al., 2001)

Cells grown on glass coverslips (VWR) were covered with a polycarbonate filter (5 μm pore size, Millipore) and irradiated with 150 J/m^2 UVC (254 nm) using a low-pressure mercury lamp (Vilbert-Lourmat). Conditions were set using a VLX-3W dosimeter (Vilbert-Lourmat).

Immunofluorescence

Cells grown on glass coverslips (VWR) were either fixed directly with 2% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS, or pre-extracted before fixation with 0.5% Triton X-100 in CSK buffer (Cytoskeletal buffer: 10 mM PIPES pH 7.0, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl_2). Samples were blocked in 5% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) in PBS supplemented with 0.1% Tween before incubation with primary antibodies and secondary antibodies conjugated to Alexa-Fluor 594 or 680 (Invitrogen) (see Table S4 for a description of the antibodies). Coverslips were mounted in Vectashield medium with DAPI (Vector laboratories) and cells were imaged with a Leica DMI6000 epifluorescence microscope using a 63x oil objective.

Cell line (reference)	Selection antibiotics
U2OS H3.3-SNAP (Dunleavy et al., 2011)	G418
U2OS H3.3-SNAP GFP	G418
U2OS H3.3-SNAP GFP-XPC	G418 + Hygromycin
U2OS H3.3-SNAP CFP-XPC	G418 + Hygromycin
U2OS H3.3-SNAP GFP-DDB2	G418 + Hygromycin
U2OS H3.1-SNAP GFP-XPC (U2OS H3.1 SNAP from (Dunleavy et al., 2011))	G418 + Hygromycin
U2OS H3.3-PA-GFP RFP-XPC	G418 + Hygromycin
U2OS LacO H3.3-SNAP (U2OS LacO from (Beuzer et al., 2014; Soutoglou et al., 2007))	G418

Table S1: Stable cell lines.

Antibiotics: G418 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen), Hygromycin (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Euromedex).

Designation	Target sequence
siCUL4A	5' GAAUCCUACUGCUGAUCGA 3'
siDDB1	5' GCAAGGACCUGCUGUUUAU 3'
siDDB2	5' UCACUGGGCUGAAGUUUAA 3',
siDDB2#2	5' UCAGUUCGCUUAAUGAAUU 3'
siERCC6	5' GAAGAGUUGUCAGUGAUUA 3'
siH3.3	1:1 combination of siH3.3A: 5' CUACAAAAGCCGCUCGCAA 3' and siH3.3B: 5' GCUAAGAGAGUCACCAUCAU 3'
siHIRA	5' GGAGAUGACAAACUGAUUA 3'
siLUC (Luciferase)	5' CGUACGCGGAAUACUUCGA 3'
siXPG	5' GAAAGAAGAUGCUGAAACGU 3'

Table S2: siRNA sequences.

Plasmid	Construct details
H3.3-SNAP	<i>H3F3B</i> coding sequence cloned into pSNAPm (New England Biolabs) (Dunleavy et al., 2011)
H3.1-SNAP	<i>HIST1H3C</i> coding sequence cloned into pSNAPm (New England Biolabs) (Dunleavy et al., 2011)
H3.3-PA-GFP	<i>H3F3B</i> coding sequence in frame with PA-GFP in PA-GFP-N1 (Patterson and Lippincott-Schwartz, 2004) subcloned into pSNAPm replacing the SNAP tag sequence
GFP	pEGFP-C1 (Clontech)
GFP-PCNA	(Leonhardt et al., 2000)
GFP-XPC	Flag-GFP-XPC in pIRESHyg (Clontech) (Nishi et al., 2009)
RFP-XPC	RFP from mRFP-C1 (Campbell et al., 2002) subcloned into CFP-XPC plasmid, replacing CFP
CFP-XPC	CFP-XPC (Montpellier Genomic Collections) subcloned into pBabe Hygro (Cell Biolabs)
GFP-DDB2	<i>DDB2</i> coding sequence (Montpellier Genomic Collections) subcloned into GFP-XPC plasmid, replacing XPC
mCherry-lacR	mCherry-lacR-NLS (Soutoglou and Misteli, 2008)
mCherry-lacR-DDB2	DDB2 in mCherry-lacR (Luijsterburg et al., 2012)

Table S3: Plasmids.

All the coding sequences for histone variants and repair factors are of human origin except lacR-fused DDB2, which is murine.

Type	Antibody	Species	Dilution	Application	Supplier (reference)
Primary	CUL4A	Rabbit	1:2000	WB	Bethyl Laboratories (A300-739A)
	DDB1	Rabbit	1:2000	WB	Abcam (ab21080)
	DDB2	Mouse	1:200	WB	Abcam (ab51017)
	DsRed	Rabbit	1:1000	WB	Clontech (632496)
	ERCC6	Rabbit	1:500	WB	Santa Cruz Biotechnology (sc-25370)
	GFP	Mouse	1:1000	WB	Roche Applied Science (11814460001)
	H3.3	Mouse	1:200	WB	Abnova (H00003021-M01)
	HIRA	Mouse	1:200	WB	Active Motif (39557)
	Nucleolin	Rabbit	1:1000	IF	Santa Cruz Biotechnology (sc-13057)
	SNAP	Rabbit	1:1000	WB	Pierce Antibodies (CAB4255)
	Tubulin	Mouse	1:10 000	WB	Sigma-Aldrich (T9026)
	XPC	Mouse	1:500	WB	Genetex (GTX70294)
	XPG	Mouse	1:50	IF	Merck Millipore (05-923)
Secondary	Anti-Mouse HRP	Goat	1:10 000	WB	Jackson Immunoresearch (115-035-068)
	Anti-Rabbit HRP	Donkey	1:10 000	WB	Jackson Immunoresearch (711-035-152)
	Anti-Rabbit 680	Goat	1:10 000	IF	Invitrogen (A21109)
	Anti-Mouse 594	Goat	1:10 000	IF	Invitrogen (A11032)

Table S4: Antibodies.

Designation	Sequence	Final concentration	Supplier
H3F3A_F	5'GATGGCAACTAAATGGTGTGTTG ^{3'}	500 nM	Eurofins MWG Operon
H3F3A_R	5'CAGGAACAGCACAGAAGACAG ^{3'}		
H3F3B_F	5'CAACCCAGAAGGCGAAGATA ^{3'}		
H3F3B_R	5'TTTCTCCTTTGCCTCTGCTC ^{3'}		
GAPDH_F	5'CAAGGCTGTGGGCAAGGT ^{3'}		
GAPDH_R	5'GGAAGGCCATGCCAGTGA ^{3'}		

Table S5: PCR primers.

F : forward ; R : reverse.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Beuzer, P., Quivy, J.-P., and Almouzni, G. (2014). Establishment of a replication fork barrier following induction of DNA binding in mammalian cells. *Cell Cycle* 13, 1607–1616.

Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 7877–7882.

Dunleavy, E.M., Almouzni, G., and Karpen, G.H. (2011). H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G1 phase. *Nucleus* 2, 146–157.

Katsumi, S., Kobayashi, N., Imoto, K., Nakagawa, A., Yamashina, Y., Muramatsu, T., Shirai, T., Miyagawa, S., Sugiura, S., Hanaoka, F., et al. (2001). In situ visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts. *The Journal of Investigative Dermatology* 117, 1156–1161.

Leonhardt, H., Rahn, H.P., Weinzierl, P., Sporbert, A., Cremer, T., Zink, D., and Cardoso, M.C. (2000). Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol* 149, 271–280.

Luijsterburg, M.S., Lindh, M., Acs, K., Vrouwe, M.G., Pines, A., van Attikum, H., Mullenders, L.H., and Dantuma, N.P. (2012). DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J Cell Biol* 197, 267–281.

Moné, M.J., Volker, M., Nikaido, O., Mullenders, L.H., van Zeeland, A.A., Verschure, P.J., Manders, E.M., and van Driel, R. (2001). Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Rep* 2, 1013–1017.

Nishi, R., Alekseev, S., Dinant, C., Hoogstraten, D., Houtsmuller, A.B., Hoeijmakers, J.H.J., Vermeulen, W., Hanaoka, F., and Sugasawa, K. (2009). UV-DDB-dependent regulation of nucleotide excision repair kinetics in living cells. *DNA Repair (Amst)* 8, 767–776.

Patterson, G.H., and Lippincott-Schwartz, J. (2004). Selective photolabeling of proteins using photoactivatable GFP. *Methods* 32, 445–450.

Soutoglou, Dorn, Sengupta, Jasin, Nussenzweig, Ried, Danuser, and Misteli (2007). Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 9, 675-682.

Soutoglou, E., and Misteli, T. (2008). Activation of the Cellular DNA Damage Response in the Absence of DNA Lesions. *Science* 320, 1507-1510.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1: Parental histone H3 dynamics in UVC-damaged chromatin regions. Related to Figure 1.

(A) Characterization by western blot of U2OS cell lines stably expressing H3.3-SNAP and GFP-XPC or H3.3-PAGFP and RFP-XPC. e: epitope tag, *: aspecific band.

(B) Immunostaining for nucleolin in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-XPC fixed 15 min after UVC laser micro-irradiation. Parental H3.3-SNAP histones were labeled in red as in Figure 1. Fluorescence profiles along the line crossing the UVC-damaged area (white arrowhead) and a nucleolus (empty arrowhead) are displayed on the graphs.

(C) Scheme of the experimental strategy for tracking parental histone dynamics at DNA damage sites based on photo-activation of PA-GFP-tagged H3.3 histones in the whole nucleus 48 h before UVC laser micro-irradiation and live cell imaging.

(D) Distribution of parental histones H3.3 (green) at the indicated time points after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-PA-GFP and RFP-XPC (repair factor).

(E) Dynamics of parental histones H3.3 (green) at early time points after local damage induced by UVC laser micro-irradiation as in (D). Paraformaldehyde-fixed cells were used as a control for photo-bleaching of the green fluorescence by the UVC laser. White arrowheads indicate the illuminated areas. The graphs show quantifications of the green fluorescence associated with parental H3.3 in illuminated areas, normalized to the green fluorescence in the same areas before laser micro-irradiation. Error bars represent SD from n cells scored in two independent experiments.

(F) Distribution of parental histones H3.3 (red) 15 min after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and transiently transfected with GFP-PCNA. PCNA focal pattern is characteristic of S phase cells.

(G) Distribution of parental histones H3.1 before and 15 min after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.1-SNAP and GFP-XPC. White arrowheads indicate the irradiated areas. The boxplots show quantifications of red fluorescence loss in irradiated areas at 15 min compared to before laser micro-irradiation (data from n cells scored in two independent experiments). Scale bars, 10 μm .

Figure S2: Conservative redistribution of parental histones to the periphery of UVC-damaged regions. Related to Figure 2.

(A) Experimental procedure for measuring parental histone loss and redistribution around the UVC damaged area based on photo-activation of a 20 μm^2 patch of pre-existing H3.3-PA-GFP histones in the cell nucleus and micro-irradiation in the center of the fluorescent histone patch with a 266 nm UVC laser (damage induction) or with a 488 nm bleaching laser (control). Fluorescence measurements are performed on 2D projections of 3D acquisitions in concentric regions around the site of laser micro-irradiation.

(B) Fluorescent patches of parental histones H3.3 (green) before and 15 min after local UVC damage (left) or local photo-bleaching (right) in U2OS cells stably expressing H3.3-PA-GFP and RFP-XPC. Green dotted lines delineate the cell nuclei. The edges of the fluorescent patches of parental histones before and 15 min after local irradiation are shown in white on the zoomed images.

(C) Quantification of the green fluorescence associated with parental H3.3-PA-GFP histones in concentric regions around the UVC damage site (purple) or the site of fluorescence bleaching with the 488 nm laser (green) at the indicated time points.

(D) Difference in green fluorescence distribution between the two time points obtained by subtracting 0 min from 15 min values quantified in (C). The position of the repair zone is based on RFP-XPC accumulation at 15 min. Error bars represent SD from n cells scored in two independent experiments.

(E) Fluorescent patches of parental histones H3.3 (red) before and 15 min after UVC laser micro-irradiation, followed by detergent extraction (Tx) in live U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP. GFP solubilization is used as a control for Tx extraction. The graph displays quantification of red fluorescence distribution in concentric regions around the UVC damage site before (-Tx) and after detergent extraction (+Tx) as depicted on the scheme (data from n cells scored in two independent experiments). Scale bars, 10 μm .

Figure S3: Parental histone redistribution is controlled by the repair factor DDB2. Related to Figure 3.

(A) Simplified scheme of the NER pathway showing the different repair factors that were targeted by siRNAs in this study. GG-NER: Global Genome NER, TC-NER: Transcription-Coupled NER.

(B, C) Distribution of parental histones H3.3 (red) 15 min after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-XPC treated with the indicated siRNAs (siLUC: control). siRNA efficiencies were verified by immunofluorescence 30 min after UVC irradiation through a micropore filter or by western-blot. The black arrowhead indicates full-length ERCC6 and the empty arrowheads points to a splice variant.

(D) Distribution of parental histones H3.3 (red) 15 min after UVC laser micro-irradiation in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-DDB2 treated with the proteasome inhibitor MG132 or DMSO (vehicle). The efficiency of MG132 treatment was verified by immunoblot against ubiquitin (Ub). White arrowheads indicate the irradiated areas. Scale bars, 10 μm . The boxplots show quantifications of red fluorescence loss in irradiated areas at 15 min compared to before laser micro-irradiation (data from n cells scored in two independent experiments).

Figure S4: Recovery of parental histones coupled to repair progression. Related to Figure 5.

(A) Characterization by western blot of the U2OS cell line stably expressing H3.3-SNAP and CFP-XPC. e: epitope tag.

(B) Dynamics of parental histones H3.3 (red) at the indicated points after local damage with the UVC laser (white arrowheads) or local bleaching of the red fluorescence with a 555 nm laser (empty arrowheads) in U2OS cells stably expressing H3.3-SNAP and GFP-XPC. The graph shows quantification of red fluorescence recovery in illuminated areas. Cells that did not repair efficiently (based on GFP-XPC retention) were excluded from the analysis.

(C) Dynamics of parental histones H3.3 (green) at the indicated time points after local UVC damage (white arrowheads) in U2OS cells stably expressing H3.3-PA-GFP and RFP-XPC. The graph shows quantification of green fluorescence recovery in illuminated areas. Error bars on the graphs represent SD from n cells scored in two independent experiments. Scale bars, 10 μm .

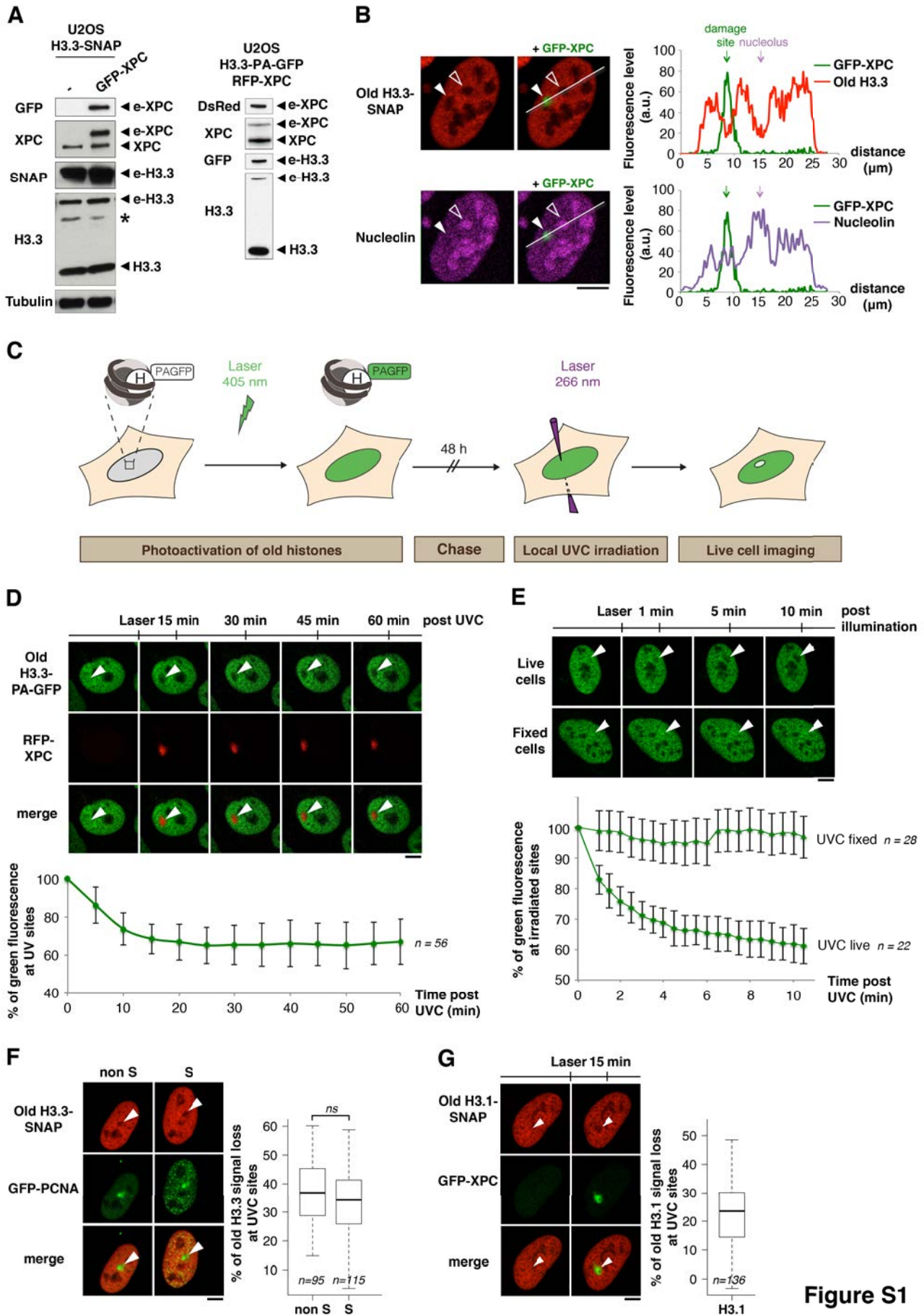


Figure S1

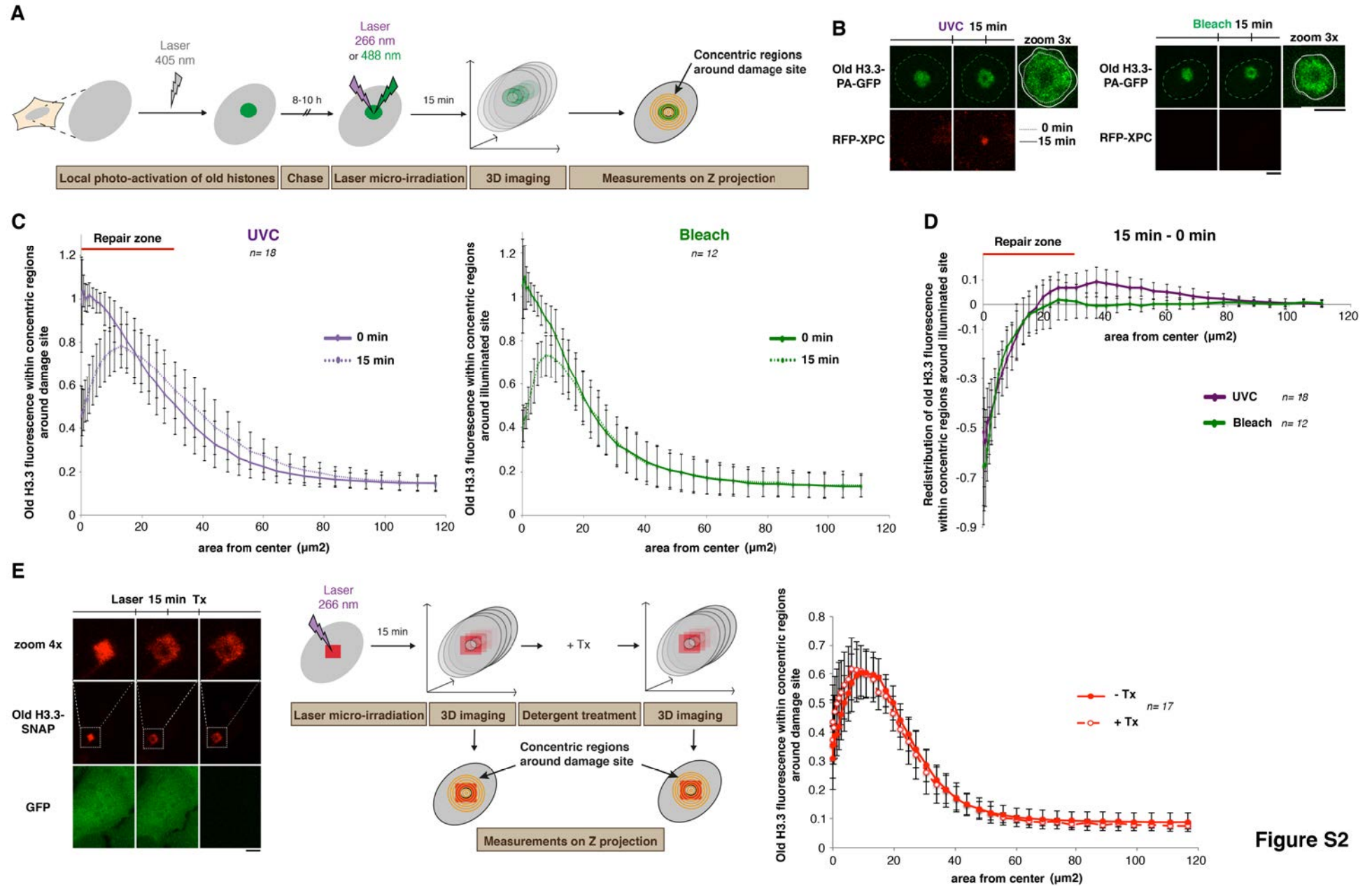


Figure S2

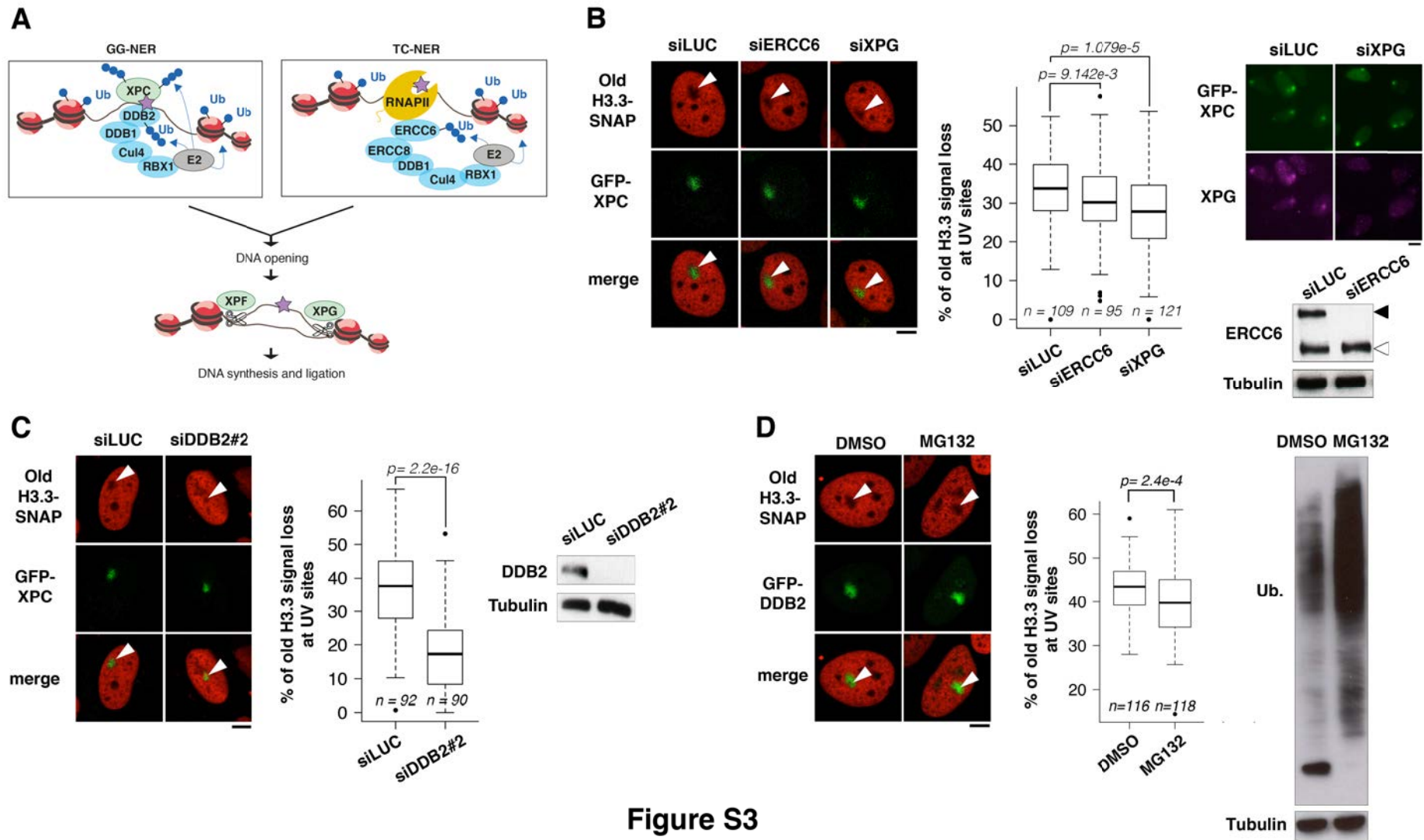


Figure S3

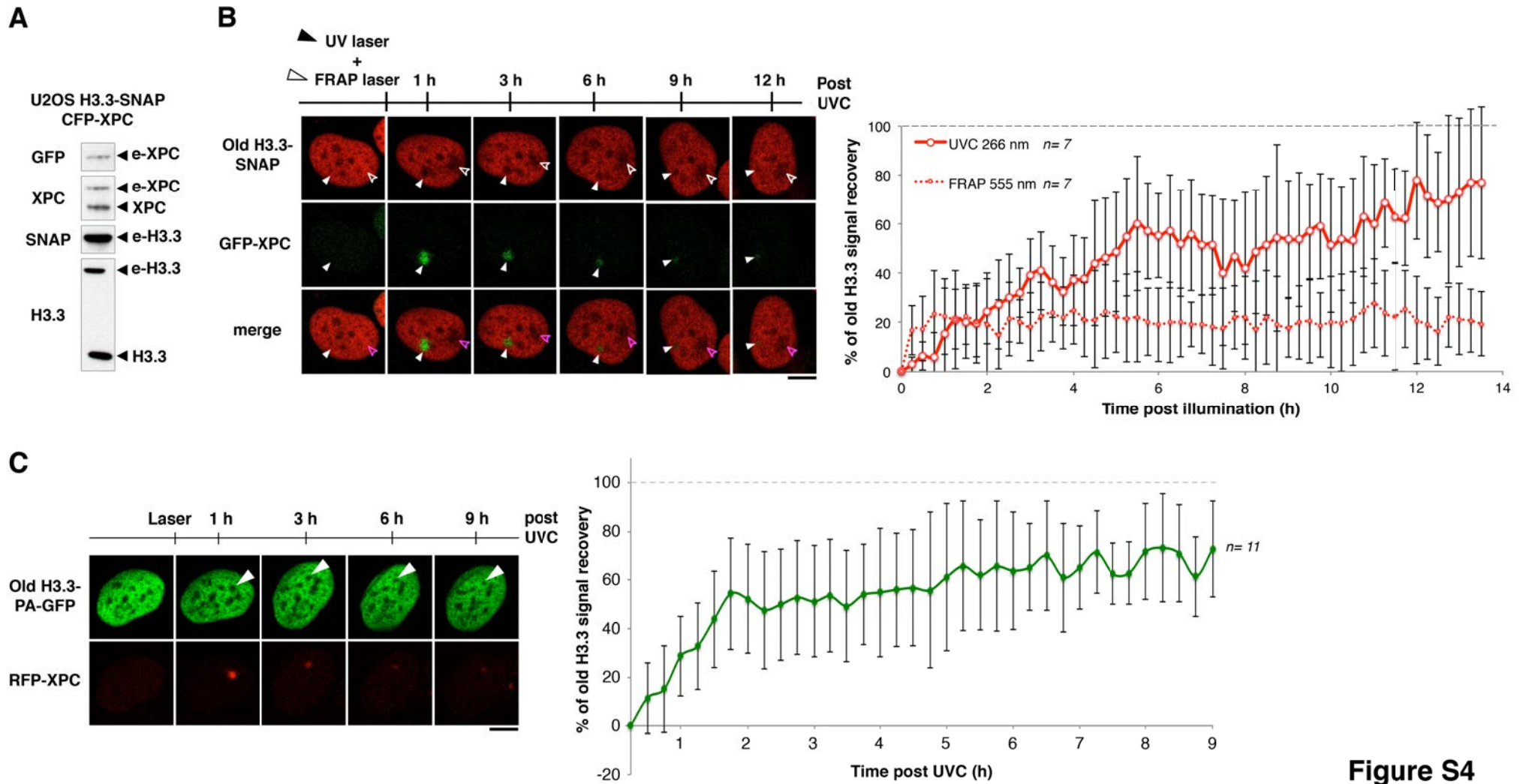


Figure S4

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Au cours de ma thèse, j'ai abordé la question du maintien de l'intégrité de l'information épigénétique en réponse à un stress génotoxique grâce à une étude détaillée et comparée de la dynamique des histones H3 parentales et néo-synthétisées après dommages de l'ADN générés par les rayons UV dans des cellules humaines. Dans cette dernière partie, je vais vous récapituler les principales conclusions de mon travail et les questions qu'elles soulèvent, concernant les mécanismes et l'importance fonctionnelle de la plasticité de la chromatine en réponse aux lésions de l'ADN (pour plus de détails, cf. **Annexe 4**). Je discuterai finalement comment les résultats que j'ai obtenus devraient permettre de mieux comprendre le lien entre altérations de la dynamique de la chromatine après stress génotoxique et pathologies.

1. Apport des résultats au modèle « Accessibilité-Réparation-Restitution »

Mon travail de thèse a permis d'affiner nos connaissances sur la dynamique des histones H3 en réponse aux dommages de l'ADN grâce à l'exploitation combinée de deux nouvelles technologies, la micro-irradiation laser UVC et le système SNAP permettant le suivi simultané en temps réel des histones parentales et néo-synthétisées. En particulier, les résultats que j'ai obtenus permettent de compléter notre vision du modèle décrivant les réarrangements de la chromatine induits par les lésions de l'ADN, le « modèle Accessibilité-Réparation-Restitution » (**Figure 17**).

Tout d'abord, nos connaissances concernant les mécanismes contrôlant *in vivo* l'accessibilité de la chromatine endommagée étaient très limitées (**Figure 18**). Une étude laissait présager que les histones H3 sont en partie solubilisées après irradiation globale aux UVC (Wang et al., 2006a), une autre suggérait que la chromatine lésée est décondensée (Luijsterburg et al., 2012). Ici, nos résultats démontrent que les **histones H3 parentales ne sont pas massivement solubilisées mais au contraire redistribuées en périphérie du site lésé et ce de manière DDB2-dépendante** (cf. partie résultats 3, données cohérentes avec l'étude développée par (Luijsterburg et al., 2012)). Une perte de signal correspondant aux histones H1, H2A et H4 ayant été rapportée dans les régions de chromatine endommagées aux UVC (Luijsterburg et al., 2012), il serait intéressant de déterminer également le devenir de ces histones « mobilisées » : sont-elles redistribuées autour de la zone lésée comme H3? Ou sont-elles au moins en partie solubilisées? Cette analyse permettrait de comprendre comment la dynamique des histones est coordonnée dans l'espace et le temps et d'évaluer sous quelle forme les histones sont « mobilisées » : molécule unique? dimère? tétramère? particule nucléosomale? En outre, nous avons mis en évidence **que la désorganisation de la chromatine en réponse à une irradiation localisée aux UVC est un processus local**, et non global comme cela avait été précédemment avancé (Rubbi and Milner, 2003). Est-ce que

l'organisation de la chromatine en territoires chromosomiques (Cremer and Cremer, 2010) régule l'étendue des altérations de la structure de la chromatine après lésions de l'ADN en imposant des barrières structurales au-delà desquelles la chromatine ne peut se désorganiser ? Cette question mérite des recherches complémentaires. Il sera aussi important de prendre en considération que la chromatine n'est pas forcément désorganisée de la même manière en fonction du type de dommages générés (discuté en partie 2.1).

Mon travail de thèse affine également nos connaissances des mécanismes de restitution de l'architecture chromatinienne (**Figure 19**). En plus de l'incorporation d'histones H3.1 et H2A néo-synthétisées aux sites de chromatine endommagée (Dinant et al., 2013; Polo et al., 2006), nous avons révélé que **la mise en place de nouvelles histones H3.3** (cf. résultats partie 1) **ainsi que le « retour » d'histones H3 parentales** (cf. résultats partie 4) **participent à la réorganisation de la chromatine après irradiation locale aux UVC**. Non seulement cette dynamique des histones favorise la restitution de la structure de la chromatine (la question du maintien de l'information épigénétique est discutée en partie 2.2) mais elle permet aussi à la chromatine endommagée de redevenir fonctionnelle. En effet, **la reprise de l'activité transcriptionnelle de la chromatine endommagée nécessite la présence de HIRA, chaperon de l'histone H3.3**. Mais les mécanismes sous-jacents restent à déterminer : le redémarrage de la transcription est-il directement lié à l'incorporation de nouvelles histones H3.3 ? Ou lié au « retour » d'histones H3.3 parentales couplé à la réparation des lésions ? Ou encore la conséquence d'une autre fonction du chaperon HIRA, indépendante de la dynamique des variants H3.3 induite par les dommages de l'ADN ? (cf. résultats partie 2).

L'importance fonctionnelle de la dynamique des histones après stress génotoxique dans les voies de signalisation et de réparation des dommages de l'ADN est encore sous-évaluée. L'étude de ce phénomène chez divers organismes a conduit à l'obtention de données en apparence conflictuelles, comme c'est le cas pour le rôle de H3.3 et HIRA en réponse aux dommages de l'ADN (discuté dans les résultats partie 2.3). En effet, une perte d'expression de l'histone H3.3 chez le poulet (Frey et al., 2014), ou d'une des protéines orthologues de HIRA chez la levure *S. pombe* (Blackwell et al., 2004; Kanoh and Russell, 2000), conduit à une hypersensibilité à une irradiation aux UVC, ce qui n'est pas le cas après diminution de l'expression de HIRA dans les cellules humaines (nos données). Enfin, dans le modèle « Accessibilité-Réparation-Restitution », nous considérons généralement que la plasticité de la chromatine associée aux étapes précoces de réparation permet de rendre l'ADN endommagé accessible aux machineries de réparation tandis que la dynamique des histones couplée aux étapes tardives contribue à restituer l'intégrité structurale et fonctionnelle de la chromatine. Néanmoins, cette considération a ses limitations, comme l'illustrent les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse : le chaperon HIRA est recruté tôt aux sites de dommages UVC, de manière couplée à la détection des lésions, mais ne contrôle pas la

réparation globale de ces dommages dans les cellules humaines. Au contraire, il est requis pour la réactivation de la production d'ARN dans les régions de chromatine réparées, soit quelques heures après qu'il se soit décroché de la chromatine lésée (cf. résultats partie 2.3). D'autres facteurs de la dynamique de la chromatine régulant la reprise de l'activité transcriptionnelle des cellules endommagées aux UVC sont également recrutés rapidement aux sites de lésions de l'ADN, comme la sous-unité ATPase SMARCA5 (Aydin et al., 2014) et le chaperon d'histones FACT (Dinant et al., 2013). Mais SMARCA5 est impliqué dans le recrutement de CSB, facteur précoce de la réparation TC-NER tandis que FACT persiste plus longtemps que HIRA enrichi dans les régions de chromatine lésées. Donc, l'action précoce et transitoire de HIRA dans le redémarrage de la transcription en réponse à un stress génotoxique semble être caractéristique de ce chaperon d'histones.

2. Perspectives

Au cours de ma thèse, j'ai examiné la dynamique des histones H3 en réponse à une irradiation aux UVC au sein de lignées cellulaires humaines en prolifération. Il est donc fort probable que les résultats que j'ai obtenus ne soient pas directement généralisables à tous les types cellulaires et à tous les agents génotoxiques auxquels ces cellules doivent faire face. Vu le rôle capital de la chromatine dans le maintien des fonctions cellulaires, la plasticité de l'organisation chromatinienne en réponse aux lésions de l'ADN doit être finement régulée. Divers paramètres, présentés ci-dessous, sont susceptibles de contrôler cette plasticité (**Figure 24**).

2.1. Paramètres pouvant contrôler la dynamique des histones en réponse aux dommages de l'ADN

2.1.1. Type de dommages de l'ADN et de voies de réparation

Tout d'abord, la détection et réparation efficaces des lésions de l'ADN ne nécessitent vraisemblablement pas le même degré de désorganisation de la chromatine en fonction de la nature des lésions et de leur localisation dans le génome (**Figure 24**). En effet, si nous prenons l'exemple des dommages générés par les rayons UVC, les dimères de pyrimidine de type 6-4PP sont facilement reconnus par la machinerie de réparation car ils entraînent une distorsion importante de la structure de l'ADN (Kim et al., 1995) et sont de plus majoritairement situés au niveau de l'ADN lien (Mitchell et al., 1990). Par contre, les CPD présents au sein de particules nucléosomales dans les régions compactes de chromatine (Gale and Smerdon, 1988), doivent être exposés afin d'être détectés, vraisemblablement par ouverture de la chromatine et/ou déstabilisation des nucléosomes endommagés.

En outre, différents niveaux de réorganisation de la chromatine pourraient être mis en jeu en fonction de la voie utilisée par les cellules pour réparer leur ADN lésé (**Figure 24**). La réparation des cassures double brin de l'ADN constitue un exemple typique de ces différences. Lors de la réparation des cassures par jonction directe des extrémités endommagées (EJ), seules les histones situées en périphérie de la particule cœur du nucléosome, les histones H2A et H2B, sont « déplacées » des sites de cassures (Goldstein et al., 2013). A l'opposé, la réparation de ces mêmes cassures par recombinaison homologue (HR), qui requiert la formation d'une longue molécule d'ADN simple brin, est associée à une perte de toutes les histones formant le cœur du nucléosome (Goldstein et al., 2013). De plus, dans ce contexte de réparation par recombinaison homologue, une étude récente suggère que non seulement la région d'ADN portant la cassure doit être réorganisée mais aussi la région homologue, afin de favoriser la réparation (Courilleau et al., 2012). Il serait donc intéressant

d'effectuer des analyses détaillées et comparatives de la dynamique des histones en réponse à différents agents génotoxiques, afin de préciser l'impact de divers types de dommages de l'ADN sur le niveau de désorganisation de la chromatine. Une étude approfondie de la plasticité de la chromatine en réponse aux lésions de l'ADN programmées par les cellules, par exemple au cours de la méiose et de l'établissement du répertoire immunitaire des lymphocytes, est également nécessaire car nos connaissances dans ce domaine sont actuellement limitées (Aida et al., 2013; Bevington and Boyes, 2013; Brachet et al., 2012).

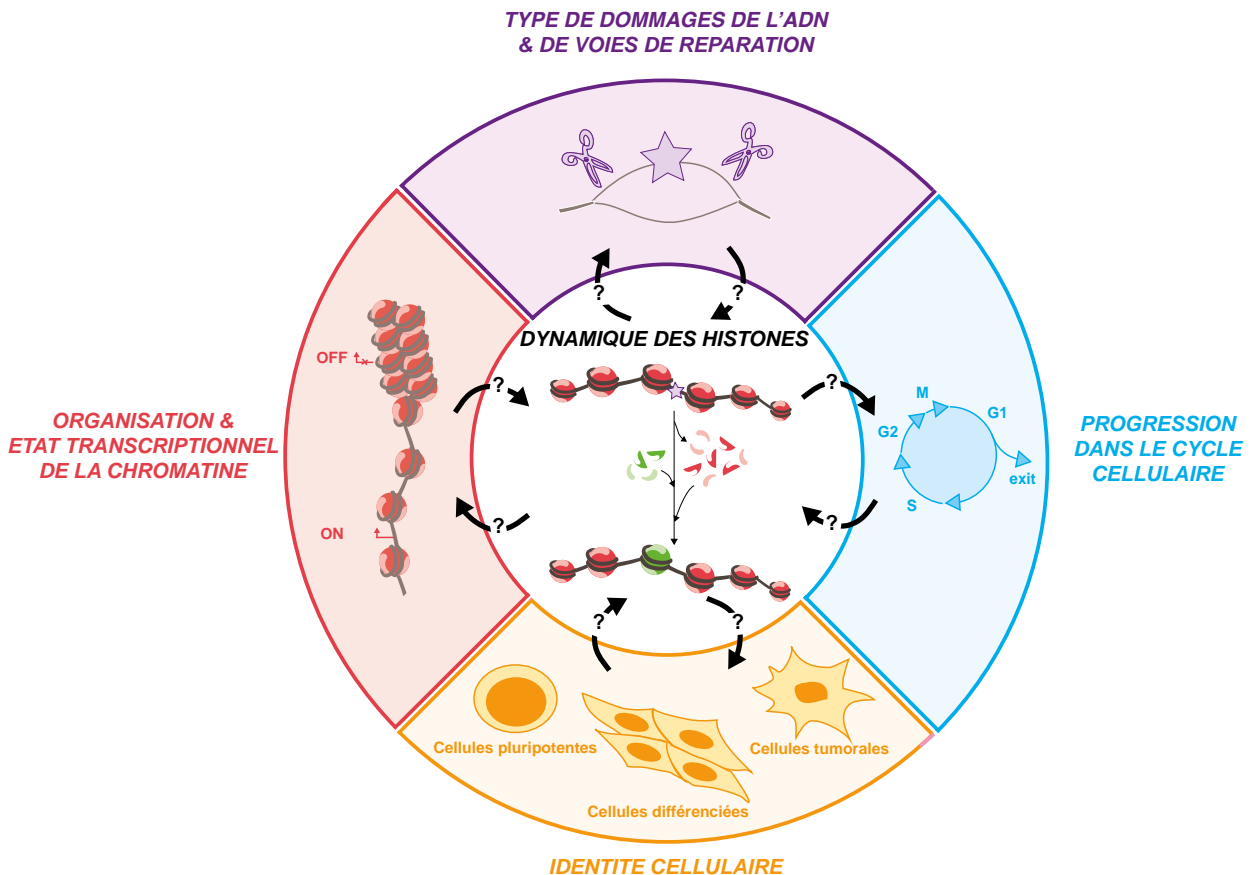


Figure 24 : Couplage entre les fonctions cellulaires et la dynamique des histones dans la chromatine endommagée. La mise en place d'histones porteuses de nouvelles informations (vertes) en lieu et place des histones parentales (rouges) en réponse aux dommages de l'ADN modifie, au moins transitoirement, la structure et la fonction de la chromatine lésée. De futures recherches devraient permettre de préciser : (1) quelle est l'importance fonctionnelle de cette dynamique pour la régulation des activités de transcription et de réparation de l'ADN ? (2) quel est l'impact de cette dynamique sur le maintien de l'identité cellulaire en situation normale (en particulier sur le pouvoir de prolifération et de différenciation des cellules) et en situation pathologique ? (3) comment l'organisation initiale de la chromatine, en fonction de la nature du dommage induit et du type cellulaire endommagé, contrôle la dynamique des histones après stress génotoxique ? Figure adaptée de l'Annexe 4.

2.1.2. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire constitue un autre paramètre susceptible de contrôler la dynamique des histones en réponse aux dommages de l'ADN (**Figure 24**). En effet, certaines phases du cycle cellulaire sont associées à des voies spécifiques de réparation, comme c'est le cas pour la réparation des cassures double brin de l'ADN par EJ/HR. Mais chacune des phases du cycle cellulaire est aussi caractérisée par une disponibilité et/ou une abondance différentielle des protéines histones et de leurs partenaires. Par exemple, dans les cellules non prolifératives, ayant réduit de manière conséquente la production de variants d'histones réplicatifs (Wu et al., 1982), les réarrangements de la chromatine induits par les dommages de l'ADN sont-ils différents de ceux engendrés dans les cellules en prolifération ? La chromatine est-elle désorganisée de la même manière dans les cellules en interphase ou en mitose, ces dernières étant caractérisées par une compaction massive de leur chromatine ? La dynamique des histones est-elle différente dans des cellules endommagées quand leur chromatine est en cours de réplication ? La plupart des études actuelles, y compris celles que j'ai développées, utilisent des lignées cellulaires non synchronisées afin d'examiner la plasticité de la chromatine en réponse aux lésions de l'ADN. Il serait donc intéressant de comparer cette dynamique avec celle des cellules non prolifératives comme les cellules en quiescence, ainsi que celle de cellules synchronisées à différents stades du cycle cellulaire. Ces recherches devraient permettre de mieux comprendre l'impact du cycle sur les réarrangements de la chromatine après stress génotoxique.

2.1.3. Organisation et état transcriptionnel de la chromatine

La compaction et l'état transcriptionnel de la chromatine ont aussi, sans aucun doute, une influence sur la plasticité de la chromatine induite par les dommages de l'ADN (**Figure 24**). D'une part, l'hétérochromatine, structure très compacte et peu transcrite du génome, généralement considérée comme une barrière empêchant une détection et une réparation efficace des lésions (cf. revues (Lemaître and Soutoglou, 2014; Soria et al., 2012)), pourrait être décompactée afin de lever cette barrière. Par contre, les régions d'euchromatine activement transcrites du génome, pourraient être compactées (cf. introduction partie 3.4.1), afin d'arrêter l'activité transcriptionnelle et empêcher toute interférence entre les machineries de réparation et de transcription de l'ADN (cf. revue (Svejstrup, 2010)). Afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses, il serait judicieux d'examiner la dynamique de la chromatine après stress génotoxique, dans des cellules où des domaines d'euchromatine et d'hétérochromatine sont facilement reconnaissables, par exemple dans des cellules femelles humaines où le chromosome X inactif est une région cytologiquement identifiable d'hétérochromatine, qu'on peut envisager d'endommager spécifiquement par micro-irradiation laser.

2.1.4. Type cellulaire et état de différenciation

La dynamique de la chromatine diffère également en fonction du type cellulaire, comme l'illustre l'exemple des cellules pluripotentes, caractérisées par une plasticité accrue de leur architecture chromatinienne par rapport aux cellules différenciées (cf. revue (Burton and Torres-Padilla, 2014)). Cette caractéristique pourrait donc influencer façon dont la chromatine est réarrangée après dommages de l'ADN (**Figure 24**). Il serait donc intéressant d'examiner ces réarrangements non seulement dans des cellules individuelles mais aussi à l'échelle de l'organisme, à différentes étapes de son développement. Ces études devraient ainsi permettre de mieux comprendre comment l'identité de chaque cellule est préservée en réponse à un stress génotoxique, nos connaissances dans le domaine étant encore actuellement limitées.

2.2. Impact de la dynamique des histones en réponse aux lésions de l'ADN sur le maintien de l'information épigénétique

Dès la fin des années 1980, sur la base d'expériences de sensibilité aux nucléases de la chromatine en cours de réparation (cf. revue (Smerdon, 1991)), il avait été proposé que les régions de chromatine endommagées aux UVC sont réorganisées en deux étapes : une première étape au cours de laquelle l'ADN réparé est de nouveau enroulé autour de particules nucléosomales, et une deuxième étape correspondant à un repositionnement des nucléosomes afin de restituer la configuration initiale de la chromatine. Les données que j'ai obtenues au cours de ma thèse valident cette restitution bi-phasique de l'architecture chromatinienne, puisque nous avons démontré, cette fois-ci à l'échelle des histones, qu'une phase initiale d'incorporation de nouvelles histones H3.3 précède le « retour » d'histones parentales aux sites de micro-irradiation laser (cf. résultats partie 4).

Dans notre étude, nous avons également mis en évidence que les nouvelles histones incorporées, qui ne sont pas nécessairement en tous points identiques aux anciennes, en particulier en ce qui concerne leurs modifications post-traductionnelles (Loyola et al., 2006), persistent dans les régions de chromatine endommagées, au moins jusque 24 h après induction de dommages locaux de l'ADN. Ce constat soulève de nombreuses interrogations concernant le maintien de l'information épigénétique en réponse à un stress génotoxique :

– *Quelle est la contribution relative de l'incorporation de nouvelles histones dans la restitution de la chromatine endommagée par rapport au retour d'histones parentales?* La technologie SNAP pourrait être mise à profit pour comparer la quantité d'anciennes histones « mobilisées » et de nouvelles histones mises en place aux sites de dommages. Afin de mieux appréhender les mécanismes contrôlant la stabilité de l'information épigénétique, il serait aussi intéressant de déterminer si les anciennes et les nouvelles histones incorporées se retrouvent ensemble au sein d'une même particule nucléosomale. En effet, si c'est le cas, la copie des informations parentales sur les nouvelles histones pourrait être facilitée grâce à la proximité spatiale entre anciennes et nouvelles histones (cf. ci-dessous).

– *Les nouvelles histones mises en place dans la chromatine endommagée restent-elle une fois la réparation de l'ADN terminée ?* En effet, nous avons suivi la cinétique de ces histones au maximum 24 h après micro-irradiation laser UVC. Or, à ce stade, tous les dommages ne sont pas réparés, la réparation complète des dimères de pyrimidines CPD induits par les UVC nécessitant plus de 24 h (Ehmann et al., 1978). Il est donc possible que les nouvelles histones incorporées servent de signal indiquant que la réparation n'est pas encore finie. Ces histones seraient éliminées et remplacées par des

histones parentales uniquement lorsque plus aucune lésion de l'ADN n'est présente, permettant ainsi une restitution fidèle de la chromatine. Il est également possible que les nouvelles histones incorporées restent, afin de remplacer la fraction d'histones parentales susceptible d'avoir été directement endommagée par la micro-irradiation laser (cf. introduction partie 3.3.1, fraction qui ne serait pas perdue immédiatement après dommages car nous n'avons pas détecté de perte majeure d'histones à 15 min post UVC). Une analyse à plus long terme, voire sur plusieurs générations cellulaires, de la dynamique des histones parentales et néo-synthétisées post micro-irradiation laser UVC est donc nécessaire afin de répondre à cette question.

– *Les nouvelles histones incorporées dans la chromatine réparée apportent-elle vraiment une nouvelle information qui met en péril l'intégrité de l'information épigénétique ?* Même si ces nouvelles histones persistent, la nouvelle information qu'elles portent pourrait être remplacée par l'information initialement véhiculée par la chromatine, grâce à un mécanisme similaire à celui observé au cours de réplication de la chromatine (Alabert et al., 2015). En effet, si les cellules parviennent à maintenir l'intégrité de leur information épigénétique pendant la réplication, après dilution de 50% des histones préexistantes, il est vraisemblable qu'elles puissent le faire aussi lorsque seulement 40% des histones parentales sont « mobilisées » de la zone de chromatine endommagée (cf. résultats partie 3). Pour cela, il faudrait que la composition en variants d'histones de la chromatine avant et après dommages de l'ADN soit la même et que les marques post-traductionnelles portées par les histones parentales soient transmises aux nouvelles histones incorporées aux sites de dommages.

– *Les histones parentales qui sont préservées dans les régions de chromatine endommagées (environ 60%) portent-elles toujours l'information d'origine tout au long de la réparation de l'ADN ?* Il est fort probable que ce ne soit pas le cas, vu l'ensemble des modifications post-traductionnelles qui affectent les histones en réponse à un stress génotoxique (cf. introduction partie 3.2). Ainsi, même si au premier abord, redistribuer les histones parentales en périphérie du site de chromatine lésé apparaît comme un mécanisme menaçant l'intégrité de l'information épigénétique de ce site, il est possible que ce soit, au contraire, un mécanisme conservateur. En effet, « mobiliser » des histones parentales permettrait de les placer hors de portée des enzymes de modifications des histones à l'œuvre dans la zone de chromatine endommagée, et donc de préserver intacte leur information d'origine. Le fait que les histones parentales soient conservées autour des régions de chromatine lésées faciliterait le retour de ces histones une fois la réparation et les processus de

modifications d'histones terminés. Cette restitution fidèle de l'architecture de la chromatine pourrait également être accompagnée d'une élimination active des marques d'histones apposées sur les histones parentales restées aux sites de lésions.

Ainsi, intégrer la dynamique des modifications post-traductionnelles à celle des histones parentales et néo-synthétisées en réponse aux dommages de l'ADN représente le prochain défi que devra relever la communauté scientifique. Très récemment, une approche protéomique à haut débit a été mise au point permettant de suivre en simultané les variants d'histones et leurs modifications pendant la réplication de l'ADN (Alabert et al., 2014; 2015). Cette approche innovante combinant une « capture de la chromatine naissante » et un marquage différentiel des anciennes vs nouvelles protéines par SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) a permis d'appréhender les mécanismes assurant la mémoire de l'information épigénétique tout au long du cycle cellulaire. Il serait donc intéressant de développer une approche similaire sur des cellules ayant subi un stress génotoxique.

En résumé, malgré les avancées apportées par mon travail de thèse, comment l'intégrité de l'information véhiculée par la chromatine est conservée après stress génotoxique est une question toujours d'actualité, qui mérite de faire l'objet de recherches complémentaires. Néanmoins, ce travail ouvre aussi des perspectives intéressantes sur le plan thérapeutique, ce que je vais maintenant vous illustrer.

2.3. Pathologies & cancers : dysfonctionnement de la dynamique des histones après stress génotoxique ?

Les résultats obtenus au cours de ma thèse devraient permettre de mieux comprendre la physiologie de diverses maladies, notamment des pathologies marquées par un défaut de la voie de réparation NER (cf. revues (DiGiovanna and Kraemer, 2012; Marteijn et al., 2014)) et des tumeurs associées à des mutations ponctuelles des histones H3 (cf. revues (Kallappagoudar et al., 2015; Yuen and Knoepfler, 2013)).

2.3.1. Cas des pathologies associées à un défaut de la réponse aux UVC

Des mutations dans la séquence du gène codant pour DDB2, facteur NER de détection des lésions, ont été retrouvées chez certains patients souffrant du symptôme Xeroderma Pigmentosum (patients XPE), symptôme caractérisé par un risque très élevé de cancers de la peau (cf. introduction partie 1.2.3). Ces mutations conduisent à une perte de fonction de la protéine DDB2. En fonction de la nature et de la localisation des mutations, les protéines mutées sont exprimées de manière très faible, incapables d'interagir avec l'ADN endommagé ou avec les autres membres du complexe UV-DDB, ce qui dans tous les cas, conduit à un défaut de signalisation et réparation des dommages (Itoh et al., 2003; Oh et al., 2011b; Rapić-Otrin et al., 2003). Or, dans mon travail de thèse, nous avons démontré que la protéine DDB2 est aussi un facteur clé de la plasticité de la chromatine en réponse à un stress génotoxique puisqu'elle contrôle à la fois la dynamique des histones parentales et la mise en place de nouvelles histones dans les régions de chromatine endommagées aux UVC. Il serait donc important de considérer que les symptômes développés par les patients XPE ne sont peut être pas uniquement la conséquence directe d'un défaut de réparation de l'ADN mais aussi le résultat d'altérations de la dynamique des histones en réponse aux dommages de l'ADN.

2.3.2. Cas des cancers associés à des mutations des histones H3

Récemment, l'histone H3.3, et dans une moindre mesure l'histone H3.1, a été retrouvée mutée dans différents types de cancers, affectant des tissus cérébraux, osseux et cartilagineux (cf. introduction, partie 2.3.4). Comprendre quel est l'effet tumorigène de ces mutations fait actuellement l'objet d'intenses recherches. En modifiant le profil de marques post-traductionnelles des histones H3, la présence de formes mutées d'histones altère directement les programmes d'expression génique des cellules atteintes (Bjerke et al., 2013; Lewis et al., 2013). Mais, il est envisageable qu'elles régulent aussi les voies de réponse aux dommages de l'ADN. En accord avec cette hypothèse, les cellules de poulet exprimant une forme mutée de H3.3 associée au cancer (K27M, G34V ou G34R) présentent une hypersensibilité aux UVC et au cisplatine, agent induisant des pontages intra-brin dans l'ADN (Frey et al., 2014), ce qui indique donc que ces cellules ont une réponse aux dommages

défaillante. Il serait donc intéressant d'approfondir le mécanisme sous-jacent : cette défaillance est-elle associée à un défaut de réparation des dommages de l'ADN et/ou de maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la chromatine en réponse à un stress génotoxique ? Est-elle directement liée à une dérégulation de la dynamique des histones H3.3 aux sites de lésions de l'ADN ? En effet, des données récentes de la littérature ont dévoilé que certains acides aminés de H3.3 retrouvés mutés dans des tumeurs (K36 et K27) sont requis pour l'incorporation de H3.3 couplée à l'activation transcriptionnelle (Newhart et al., 2013; Sarai et al., 2013). Il est donc possible que les cellules exprimant une forme H3.3 mutée sur ces résidus présentent un défaut de mise en place de nouvelles histones H3.3 dans la chromatine endommagée. Répondre à ces interrogations devrait permettre de mieux appréhender le potentiel oncogénique des mutations de l'histone H3.3.

En conclusion, mon travail de thèse a permis d'affiner nos connaissances actuelles sur la plasticité de la chromatine en réponse à un stress génotoxique dans les cellules humaines. En effet, il révèle que la chromatine est une plateforme complexe d'intégration du signal, sa dynamique accrue en réponse aux dommages de l'ADN participant activement au maintien de l'intégrité génétique et épigénétique des cellules. Mon travail ouvre également la voie à l'identification de nouveaux mécanismes qui, comme la dynamique dommages-induite des histones H3, contribuent à former une mémoire de l'identité de la chromatine, tout en autorisant un niveau de plasticité nécessaire pour une réponse efficace de l'organisme contre les effets potentiellement délétères des dommages de l'ADN. Enfin, les données obtenues au cours de ma thèse pourront être exploitées pour des applications médicales, afin de mieux appréhender l'impact de la dynamique de la chromatine au cours des processus de tumorigénèse et de vieillissement cellulaire, de découvrir de nouveaux facteurs de diagnostic et/ou de pronostic de ces pathologies et éventuellement d'élaborer de nouvelles pistes thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abascal, F., Corpet, A., Gurard-Levin, Z.A., Juan, D., Ochsenbein, F., Rico, D., Valencia, A., and Almouzni, G. (2013). Subfunctionalization via adaptive evolution influenced by genomic context: the case of histone chaperones ASF1a and ASF1b. *Mol. Biol. Evol.* *30*, 1853–1866.
- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M.K., Vilpo, J.A., Moncollin, V., Podust, V.N., Protić, M., Hübscher, U., Egly, J.M., and Wood, R.D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* *80*, 859–868.
- Adamson, B., Smogorzewska, A., Sigoillot, F.D., King, R.W., and Elledge, S.J. (2012). A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nat. Cell Biol.* *14*, 318–328.
- Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Molecular Cell* *9*, 1191–1200.
- Aida, M., Hamad, N., Stanlie, A., Begum, N.A., and Honjo, T. (2013). Accumulation of the FACT complex, as well as histone H3.3, serves as a target marker for somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 7784–7789.
- Akhmanova, A.S., Bindels, P.C., Xu, J., Miedema, K., Kremer, H., and Hennig, W. (1995). Structure and expression of histone H3.3 genes in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila hydei*. *Genome* *38*, 586–600.
- Akiyama, T., Suzuki, O., Matsuda, J., and Aoki, F. (2011). Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet.* *7*, e1002279.
- Alabert, C., and Groth, A. (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 153–167.
- Alabert, C., Barth, T.K., Reverón-Gómez, N., Sidoli, S., Schmidt, A., Jensen, O.N., Imhof, A., and Groth, A. (2015). Two distinct modes for propagation of histone PTMs across the cell cycle. *Genes Dev.* *29*, 585–590.
- Alabert, C., Bukowski-Wills, J.-C., Lee, S.-B., Kustatscher, G., Nakamura, K., de Lima Alves, F., Menard, P., Mejlvang, J., Rappsilber, J., and Groth, A. (2014). Nascent chromatin capture proteomics determines chromatin dynamics during DNA replication and identifies unknown fork components. *Nat. Cell Biol.* *16*, 281–293.
- Alekseev, S., and Coin, F. (2015). Orchestral maneuvers at the damaged sites in nucleotide excision repair. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Alekseev, S., Kool, H., Rebel, H., Fousteri, M., Moser, J., Backendorf, C., de Gruijl, F.R., Vrieling, H., and Mullenders, L.H.F. (2005). Enhanced DDB2 expression protects mice from carcinogenic effects of chronic UV-B irradiation. *Cancer Res.* *65*, 10298–10306.
- Allison, S.J., and Milner, J. (2003). Loss of p53 has site-specific effects on histone H3 modification, including serine 10 phosphorylation important for maintenance of ploidy. *Cancer Res.* *63*, 6674–6679.
- Almouzni, G., and Probst, A.V. (2011). Heterochromatin maintenance and establishment: lessons from the mouse pericentromere. *Nucleus* *2*, 332–338.
- Amin, A.D., Vishnoi, N., and Prochasson, P. (2012). A global requirement for the HIR complex in the assembly of chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 264–276.
- Anderson, H.E., Kagansky, A., Wardle, J., Rappsilber, J., Allshire, R.C., and Whitehall, S.K. (2010). Silencing mediated by the *Schizosaccharomyces pombe* HIRA complex is dependent upon the Hpc2-

like protein, Hip4. *PLoS ONE* 5, e13488.

Anderson, H.E., Wardle, J., Korkut, S.V., Murton, H.E., López-Maury, L., Bähler, J., and Whitehall, S.K. (2009). The fission yeast HIRA histone chaperone is required for promoter silencing and the suppression of cryptic antisense transcripts. *Molecular and Cellular Biology* 29, 5158–5167.

Andrade-Lima, L.C., Veloso, A., Paulsen, M.T., Menck, C.F.M., and Ljungman, M. (2015). DNA repair and recovery of RNA synthesis following exposure to ultraviolet light are delayed in long genes. *Nucleic Acids Res.* 43, 2744–2756.

Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugasawa, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. (2001). Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 276, 18665–18672.

Arents, G., and Moudrianakis, E.N. (1995). The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11170–11174.

Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated From Pneumococcus Type III. *J Exp Med* 79, 137–158.

Aydin, O.Z., Marteiijn, J.A., Ribeiro-Silva, C., Rodríguez López, A., Wijgers, N., Smeenk, G., van Attikum, H., Poot, R.A., Vermeulen, W., and Lans, H. (2014). Human ISWI complexes are targeted by SMARCA5 ATPase and SLIDE domains to help resolve lesion-stalled transcription. *Nucleic Acids Res.* 42, 8473–8485.

Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C.K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., Iacovoni, J.S., Daburon, V., Miller, K.M., Jackson, S.P., et al. (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 366–374.

Bader, N., and Grune, T. (2006). Protein oxidation and proteolysis. *Biol. Chem.* 387, 1351–1355.

Balaji, S., Iyer, L.M., and Aravind, L. (2009). HPC2 and ubinuclein define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes. *Mol Biosyst* 5, 269–275.

Banaszynski, L.A., Wen, D., Dewell, S., Whitcomb, S.J., Lin, M., Diaz, N., Elsässer, S.J., Chapgier, A., Goldberg, A.D., Canaani, E., et al. (2013). Hira-dependent histone H3.3 deposition facilitates PRC2 recruitment at developmental loci in ES cells. *Cell* 155, 107–120.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.

Banumathy, G., Somaiah, N., Zhang, R., Tang, Y., Hoffmann, J., Andrade, M., Ceulemans, H., Schultz, D., Marmorstein, R., and Adams, P.D. (2009). Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells. *Molecular and Cellular Biology* 29, 758–770.

Bartholomew, B. (2013). Regulating the chromatin landscape: structural and mechanistic perspectives. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 671–696.

Battu, A., Ray, A., and Wani, A.A. (2011). ASF1A and ATM regulate H3K56-mediated cell-cycle checkpoint recovery in response to UV irradiation. *Nucleic Acids Res.* 39, 7931–7945.

Behjati, S., Tarpey, P.S., Presneau, N., Scheipl, S., Pillay, N., Van Loo, P., Wedge, D.C., Cooke, S.L., Gundem, G., Davies, H., et al. (2013). Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define

chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nat. Genet.* *45*, 1479–1482.

Bender, S., Tang, Y., Lindroth, A.M., Hovestadt, V., Jones, D.T.W., Kool, M., Zapatka, M., Northcott, P.A., Sturm, D., Wang, W., et al. (2013). Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* *24*, 660–672.

Bensaude, O. (2011). Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription* *2*, 103–108.

Bergink, S., Salomons, F.A., Hoogstraten, D., Groothuis, T.A.M., de Waard, H., Wu, J., Yuan, L., Citterio, E., Houtsmuller, A.B., Neefjes, J., et al. (2006). DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev.* *20*, 1343–1352.

Bergink, S., Toussaint, W., Luijsterburg, M.S., Dinant, C., Alekseev, S., Hoeijmakers, J.H.J., Dantuma, N.P., Houtsmuller, A.B., and Vermeulen, W. (2012). Recognition of DNA damage by XPC coincides with disruption of the XPC-RAD23 complex. *J. Cell Biol.* *196*, 681–688.

Bevington, S., and Boyes, J. (2013). Transcription-coupled eviction of histones H2A/H2B governs V(D)J recombination. *Embo J.* *32*, 1381–1392.

Bérubé, N.G., Mangelsdorf, M., Jagla, M., Vanderluit, J., Garrick, D., Gibbons, R.J., Higgs, D.R., Slack, R.S., and Picketts, D.J. (2005). The chromatin-remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis. *J. Clin. Invest.* *115*, 258–267.

Billon, P., and Côté, J. (2013). Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 290–302.

Birger, Y., West, K.L., Postnikov, Y.V., Lim, J.-H., Furusawa, T., Wagner, J.P., Laufer, C.S., Kraemer, K.H., and Bustin, M. (2003). Chromosomal protein HMG1 enhances the rate of DNA repair in chromatin. *Embo J.* *22*, 1665–1675.

Bjerke, L., Mackay, A., Nandhabalan, M., Burford, A., Jury, A., Popov, S., Bax, D.A., Carvalho, D., Taylor, K.R., Vinci, M., et al. (2013). Histone H3.3 mutations drive pediatric glioblastoma through upregulation of MYCN. *Cancer Discov* *3*, 512–519.

Blackwell, C., Martin, K.A., Greenall, A., Pidoux, A., Allshire, R.C., and Whitehall, S.K. (2004). The *Schizosaccharomyces pombe* HIRA-like protein Hip1 is required for the periodic expression of histone genes and contributes to the function of complex centromeres. *Molecular and Cellular Biology* *24*, 4309–4320.

Bodor, D.L., Rodríguez, M.G., Moreno, N., and Jansen, L.E.T. (2012). Analysis of protein turnover by quantitative SNAP-based pulse-chase imaging. *Curr Protoc Cell Biol* *Chapter 8*, Unit8.8.

Bonnefoy, E., Orsi, G.A., Couble, P., and Loppin, B. (2007). The essential role of *Drosophila* HIRA for de novo assembly of paternal chromatin at fertilization. *PLoS Genet.* *3*, 1991–2006.

Bootsma, D., De Weerd-Kastelein, E.A., Kleijer, W.J., and Keyez, W. (1975). Genetic complementation analysis of xeroderma pigmentosum. *Basic Life Sci.* *5B*, 725–728.

Bowman, G.D., and Poirier, M.G. (2015). Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics. *Chem. Rev.* *115*, 2274–2295.

Bönisch, C., and Hake, S.B. (2012). Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic Acids Res.* *40*, 10719–10741.

Brachet, E., Sommermeyer, V., and Borde, V. (2012). Interplay between modifications of chromatin

and meiotic recombination hotspots. *Biol. Cell* *104*, 51–69.

Brand, M., Moggs, J.G., Oulad-Abdelghani, M., Lejeune, F., Dilworth, F.J., Stevenin, J., Almouzni, G., and Tora, L. (2001). UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIIC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *Embo J.* *20*, 3187–3196.

Braunschweig, U., Hogan, G.J., Pagie, L., and van Steensel, B. (2009). Histone H1 binding is inhibited by histone variant H3.3. *Embo J.* *28*, 3635–3645.

Brueckner, F., Hennecke, U., Carell, T., and Cramer, P. (2007). CPD damage recognition by transcribing RNA polymerase II. *Science* *315*, 859–862.

Buczkwicz, P., Hoeman, C., Rakopoulos, P., Pajovic, S., Letourneau, L., Dzamba, M., Morrison, A., Lewis, P., Bouffet, E., Bartels, U., et al. (2014). Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat. Genet.* *46*, 451–456.

Burgess, R.J., and Zhang, Z. (2013). Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 14–22.

Burton, A., and Torres-Padilla, M.-E. (2014). Chromatin dynamics in the regulation of cell fate allocation during early embryogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 723–735.

Bush, K.M., Yuen, B.T., Barrilleaux, B.L., Riggs, J.W., O'Geen, H., Cotterman, R.F., and Knoepfler, P.S. (2013). Endogenous mammalian histone H3.3 exhibits chromatin-related functions during development. *Epigenetics Chromatin* *6*, 7.

Calkins, A.S., Iglehart, J.D., and Lazaro, J.-B. (2013). DNA damage-induced inhibition of rRNA synthesis by DNA-PK and PARP-1. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7378–7386.

Canzio, D., Larson, A., and Narlikar, G.J. (2014). Mechanisms of functional promiscuity by HP1 proteins. *Trends Cell Biol.* *24*, 377–386.

Carvalho, S., Vítor, A.C., Sridhara, S.C., Martins, F.B., Raposo, A.C., Desterro, J.M., Ferreira, J., and de Almeida, S.F. (2014). SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint. *Elife* *3*, e02482.

Catez, F., Brown, D.T., Misteli, T., and Bustin, M. (2002). Competition between histone H1 and HMGN proteins for chromatin binding sites. *EMBO Rep.* *3*, 760–766.

Caudron-Herger, M., and Rippe, K. (2012). Nuclear architecture by RNA. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *22*, 179–187.

Cavellán, E., Asp, P., Percipalle, P., and Farrants, A.-K.O. (2006). The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription. *J. Biol. Chem.* *281*, 16264–16271.

Cazzalini, O., Perucca, P., Savio, M., Necchi, D., Bianchi, L., Stivala, L.A., Ducommun, B., Scovassi, A.I., and Prospero, E. (2008). Interaction of p21(CDKN1A) with PCNA regulates the histone acetyltransferase activity of p300 in nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* *36*, 1713–1722.

Cazzalini, O., Sommatis, S., Tillhon, M., Dutto, I., Bachi, A., Rapp, A., Nardo, T., Scovassi, A.I., Necchi, D., Cardoso, M.C., et al. (2014). CBP and p300 acetylate PCNA to link its degradation with nucleotide excision repair synthesis. *Nucleic Acids Res.* *42*, 8433–8448.

Chaligné, R., and Heard, E. (2014). X-chromosome inactivation in development and cancer. *FEBS*

Lett. 588, 2514–2522.

Chan, K.M., Fang, D., Gan, H., Hashizume, R., Yu, C., Schroeder, M., Gupta, N., Mueller, S., James, C.D., Jenkins, R., et al. (2013). The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev.* 27, 985–990.

Chen, W.-Y., Shih, H.-T., Liu, K.-Y., Shih, Z.-S., Chen, L.-K., Tsai, T.-H., Chen, M.-J., Liu, H., Tan, B.C.-M., Chen, C.-Y., et al. (2015). Intellectual disability-associated dBRWD3 regulates gene expression through inhibition of HIRA/YEM-mediated chromatin deposition of histone H3.3. *EMBO Rep.* 16, 528–538.

Cheng, Z., Ke, Y., Ding, X., Wang, F., Wang, H., Wang, W., Ahmed, K., Liu, Z., Xu, Y., Aikhionbare, F., et al. (2008). Functional characterization of TIP60 sumoylation in UV-irradiated DNA damage response. *Oncogene* 27, 931–941.

Cheung, V., Chua, G., Batada, N.N., Landry, C.R., Michnick, S.W., Hughes, T.R., and Winston, F. (2008). Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *PLoS Biol.* 6, e277.

Cho, I., Tsai, P.-F., Lake, R.J., Basheer, A., and Fan, H.-Y. (2013). ATP-dependent chromatin remodeling by Cockayne syndrome protein B and NAP1-like histone chaperones is required for efficient transcription-coupled DNA repair. *PLoS Genet.* 9, e1003407.

Choi, S.-Y., Jang, H., Roe, J.-S., Kim, S.-T., Cho, E.-J., and Youn, H.-D. (2013). Phosphorylation and ubiquitination-dependent degradation of CABIN1 releases p53 for transactivation upon genotoxic stress. *Nucleic Acids Res.* 41, 2180–2190.

Chow, C.-M., Georgiou, A., Szutorisz, H., Maia e Silva, A., Pombo, A., Barahona, I., Dargelos, E., Canzonetta, C., and Dillon, N. (2005). Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep.* 6, 354–360.

Christmann, M., and Kaina, B. (2013). Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res.* 41, 8403–8420.

Chu, G., and Chang, E. (1988). Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science* 242, 564–567.

Chujo, M., Tarumoto, Y., Miyatake, K., Nishida, E., and Ishikawa, F. (2012). HIRA, a conserved histone chaperone, plays an essential role in low-dose stress response via transcriptional stimulation in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 287, 23440–23450.

Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell* 40, 179–204.

Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R.E., Hoeijmakers, J.H., and Vermeulen, W. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Molecular and Cellular Biology* 20, 7643–7653.

Clynes, D., Higgs, D.R., and Gibbons, R.J. (2013). The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends Biochem. Sci.* 38, 461–466.

Cook, A.J.L., Gurard-Levin, Z.A., Vassias, I., and Almouzni, G. (2011). A specific function for the histone chaperone NASP to fine-tune a reservoir of soluble H3-H4 in the histone supply chain. *Molecular Cell* 44, 918–927.

- Corpet, A., De Koning, L., Toedling, J., Savignoni, A., Berger, F., Lemaître, C., O'Sullivan, R.J., Karlseder, J., Barillot, E., Asselain, B., et al. (2011). Asf1b, the necessary Asf1 isoform for proliferation, is predictive of outcome in breast cancer. *Embo J.* 30, 480–493.
- Corpet, A., Olbrich, T., Gwerder, M., Fink, D., and Stucki, M. (2013). Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization. *Cell Cycle* 13.
- Couldrey, C., Carlton, M.B., Nolan, P.M., Colledge, W.H., and Evans, M.J. (1999). A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunted growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2489–2495.
- Courilleau, C., Chailleux, C., Jauneau, A., Grimal, F., Briois, S., Boutet-Robinet, E., Boudsocq, F., Trouche, D., and Canitrot, Y. (2012). The chromatin remodeler p400 ATPase facilitates Rad51-mediated repair of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 199, 1067–1081.
- Cremer, T., and Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003889.
- Cui, J., Zhang, Z., Shao, Y., Zhang, K., Leng, P., and Liang, Z. (2015). Genome-Wide Identification, Evolutionary, and Expression Analyses of Histone H3 Variants in Plants. *BioMed Research International* 2015, 1–7.
- Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Lam, W.M., Skordalakes, E., Zhang, R., Franco, A.A., Brill, S.J., Adams, P.D., Berger, J.M., and Kaufman, P.D. (2003). Structure and function of the conserved core of histone deposition protein Asf1. *Curr. Biol.* 13, 2148–2158.
- Das, C., Lucia, M.S., Hansen, K.C., and Tyler, J.K. (2009). CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* 459, 113–117.
- Datta, A., Bagchi, S., Nag, A., Shiyanov, P., Adami, G.R., Yoon, T., and Raychaudhuri, P. (2001). The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. *Mutat. Res.* 486, 89–97.
- Daury, L., Chailleux, C., Bonvallet, J., and Trouche, D. (2006). Histone H3.3 deposition at E2F-regulated genes is linked to transcription. *EMBO Rep.* 7, 66–71.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 319, 1097–1113.
- Delbarre, E., Ivanauskienė, K., Küntziger, T., and Collas, P. (2013). DAXX-dependent supply of soluble (H3.3-H4) dimers to PML bodies pending deposition into chromatin. *Genome Res.* 23, 440–451.
- Delbarre, E., Jacobsen, B.M., Reiner, A.H., Sørensen, A.L., Küntziger, T., and Collas, P. (2010). Chromatin environment of histone variant H3.3 revealed by quantitative imaging and genome-scale chromatin and DNA immunoprecipitation. *Mol. Biol. Cell* 21, 1872–1884.
- Denizio, J.E., Elsässer, S.J., and Black, B.E. (2014). DAXX co-folds with H3.3/H4 using high local stability conferred by the H3.3 variant recognition residues. *Nucleic Acids Res.* 42, 4318–4331.
- DiGiovanna, J.J., and Kraemer, K.H. (2012). Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J. Invest. Dermatol.* 132, 785–796.
- Dijk, M., Typas, D., Mullenders, L., and Pines, A. (2014). Insight in the multilevel regulation of NER.

Exp. Cell Res. 329, 116–123.

Dinant, C., Ampatziadis-Michailidis, G., Lans, H., Tresini, M., Lagarou, A., Grosbart, M., Theil, A.F., van Cappellen, W.A., Kimura, H., Bartek, J., et al. (2013). Enhanced chromatin dynamics by FACT promotes transcriptional restart after UV-induced DNA damage. *Molecular Cell* 51, 469–479.

Dinant, C., Bartek, J., and Bekker-Jensen, S. (2012). Histone Displacement during Nucleotide Excision Repair. *Int J Mol Sci* 13, 13322–13337.

Dinant, C., de Jager, M., Essers, J., van Cappellen, W.A., Kanaar, R., Houtsmuller, A.B., and Vermeulen, W. (2007). Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods. *Journal of Cell Science* 120, 2731–2740.

Donahue, B.A., Yin, S., Taylor, J.S., Reines, D., and Hanawalt, P.C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8502–8506.

Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* 24, 1253–1265.

Duan, M.-R., and Smerdon, M.J. (2010). UV damage in DNA promotes nucleosome unwrapping. *J. Biol. Chem.* 285, 26295–26303.

Duc, C., Benoit, M., Le Goff, S., Simon, L., Poulet, A., Cotterell, S., Tatout, C., and Probst, A.V. (2015). The histone chaperone complex HIR maintains nucleosome occupancy and counterbalances impaired histone deposition in CAF-1 complex mutants. *Plant J.* 81, 707–722.

Dunleavy, E.M., Almouzni, G., and Karpen, G.H. (2011). H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G1 phase. *Nucleus* 2, 146–157.

Edenberg, H., and Hanawalt, P. (1972). Size of repair patches in the DNA of ultraviolet-irradiated HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta* 272, 361–372.

Ehmann, U.K., Cook, K.H., and Friedberg, E.C. (1978). The kinetics of thymine dimer excision in ultraviolet-irradiated human cells. *Biophys. J.* 22, 249–264.

Eickbush, T.H., and Moudrianakis, E.N. (1978). The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry* 17, 4955–4964.

El-Mahdy, M.A., Zhu, Q., Wang, Q.-E., Wani, G., Praetorius-Ibba, M., and Wani, A.A. (2006). Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. *J. Biol. Chem.* 281, 13404–13411.

Elsässer, S.J., Huang, H., Lewis, P.W., Chin, J.W., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2012). DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature* 491, 560–565.

Farrell, M.J., Stadt, H., Wallis, K.T., Scambler, P., Hixon, R.L., Wolfe, R., Leatherbury, L., and Kirby, M.L. (1999). HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is required for cardiac outflow tract septation. *Circ. Res.* 84, 127–135.

Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.

Feser, J., Truong, D., Das, C., Carson, J.J., Kieft, J., Harkness, T., and Tyler, J.K. (2010). Elevated histone expression promotes life span extension. *Molecular Cell* 39, 724–735.

- Filipescu, D., Müller, S., and Almouzni, G. (2014). Histone h3 variants and their chaperones during development and disease: contributing to epigenetic control. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 615–646.
- Filipescu, D., Szenker, E., and Almouzni, G. (2013). Developmental roles of histone H3 variants and their chaperones. *Trends Genet.* *29*, 630–640.
- Fischer, E.S., Scrima, A., Böhm, K., Matsumoto, S., Lingaraju, G.M., Faty, M., Yasuda, T., Cavadini, S., Wakasugi, M., Hanaoka, F., et al. (2011). The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation. *Cell* *147*, 1024–1039.
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* (Leipzig: F.C.W Vogel).
- Fong, Y.W., Cattoglio, C., and Tjian, R. (2013). The intertwined roles of transcription and repair proteins. *Molecular Cell* *52*, 291–302.
- Fontebasso, A.M., Papillon-Cavanagh, S., Schwartzenuber, J., Nikbakht, H., Gerges, N., Fiset, P.-O., Bechet, D., Faury, D., De Jay, N., Ramkissoon, L.A., et al. (2014). Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nat. Genet.* *46*, 462–466.
- Formosa, T., Ruone, S., Adams, M.D., Olsen, A.E., Eriksson, P., Yu, Y., Rhoades, A.R., Kaufman, P.D., and Stillman, D.J. (2002). Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure. *Genetics* *162*, 1557–1571.
- Fousteri, M., Vermeulen, W., Van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H.F. (2006). Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Molecular Cell* *23*, 471–482.
- Frank, D., Doenecke, D., and Albig, W. (2003). Differential expression of human replacement and cell cycle dependent H3 histone genes. *Gene* *312*, 135–143.
- Franklin, S.G., and Zweidler, A. (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* *266*, 273–275.
- Frey, A., Listovsky, T., Guilbaud, G., Sarkies, P., and Sale, J.E. (2014). Histone H3.3 Is Required to Maintain Replication Fork Progression after UV Damage. *Curr. Biol.* *24*, 2195–2201.
- Gaillard, H., and Aguilera, A. (2013). Transcription coupled repair at the interface between transcription elongation and mRNP biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1829*, 141–150.
- Gaillard, P.H., Martini, E.M., Kaufman, P.D., Stillman, B., Moustacchi, E., and Almouzni, G. (1996). Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* *86*, 887–896.
- Gaillard, P.H., Moggs, J.G., Roche, D.M., Quivy, J.P., Becker, P.B., Wood, R.D., and Almouzni, G. (1997). Initiation and bidirectional propagation of chromatin assembly from a target site for nucleotide excision repair. *Embo J.* *16*, 6281–6289.
- Gal, C., Moore, K.M., Paszkiewicz, K., Kent, N.A., and Whitehall, S.K. (2015). The impact of the HIRA histone chaperone upon global nucleosome architecture. *Cell Cycle* *14*, 123–134.
- Gale, J.M., and Smerdon, M.J. (1988). Photofingerprint of nucleosome core DNA in intact chromatin having different structural states. *J. Mol. Biol.* *204*, 949–958.
- Gale, J.M., and Smerdon, M.J. (1990). UV induced (6-4) photoproducts are distributed differently than cyclobutane dimers in nucleosomes. *Photochem. Photobiol.* *51*, 411–417.

- Gale, J.M., Nissen, K.A., and Smerdon, M.J. (1987). UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 6644–6648.
- Gamble, M.J., and Kraus, W.L. (2010). Multiple facets of the unique histone variant macroH2A: from genomics to cell biology. *Cell Cycle* *9*, 2568–2574.
- Garrick, D., Sharpe, J.A., Arkell, R., Dobbie, L., Smith, A.J.H., Wood, W.G., Higgs, D.R., and Gibbons, R.J. (2006). Loss of Atrx affects trophoblast development and the pattern of X-inactivation in extraembryonic tissues. *PLoS Genet.* *2*, e58.
- Gerlitz, G., Hock, R., Ueda, T., and Bustin, M. (2009). The dynamics of HMG protein-chromatin interactions in living cells. *Biochem. Cell Biol.* *87*, 127–137.
- Gielen, G.H., Gessi, M., Hammes, J., Kramm, C.M., Waha, A., and Pietsch, T. (2013). H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors: a marker for diffuse high-grade astrocytomas. *Am. J. Clin. Pathol.* *139*, 345–349.
- Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.-M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., et al. (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* *140*, 678–691.
- Goldstein, M., Derheimer, F.A., Tait-Mulder, J., and Kastan, M.B. (2013). Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 16874–16879.
- Gong, F., Chiu, L.-Y., Cox, B., Aymard, F., Clouaire, T., Leung, J.W., Cammarata, M., Perez, M., Agarwal, P., Brodbelt, J.S., et al. (2015). Screen identifies bromodomain protein ZMYND8 in chromatin recognition of transcription-associated DNA damage that promotes homologous recombination. *Genes Dev.* *29*, 197–211.
- Gong, F., Fahy, D., and Smerdon, M.J. (2006). Rad4-Rad23 interaction with SWI/SNF links ATP-dependent chromatin remodeling with nucleotide excision repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 902–907.
- Gong, F., Fahy, D., Liu, H., Wang, W., and Smerdon, M.J. (2008). Role of the mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complex in the cellular response to UV damage. *Cell Cycle* *7*, 1067–1074.
- Govin, J., and Khochbin, S. (2013). Histone variants and sensing of chromatin functional states. *Nucleus* *4*, 438–442.
- Green, C.M., and Almouzni, G. (2002). When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* *3*, 28–33.
- Green, C.M., and Almouzni, G. (2003). Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo. *Embo J.* *22*, 5163–5174.
- Green, E.M., Antczak, A.J., Bailey, A.O., Franco, A.A., Wu, K.J., Yates, J.R., and Kaufman, P.D. (2005). Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Curr. Biol.* *15*, 2044–2049.
- Greenall, A., Williams, E.S., Martin, K.A., Palmer, J.M., Gray, J., Liu, C., and Whitehall, S.K. (2006). Hip3 interacts with the HIRA proteins Hip1 and Slm9 and is required for transcriptional silencing and accurate chromosome segregation. *J. Biol. Chem.* *281*, 8732–8739.
- Groisman, R., Kuraoka, I., Chevallier, O., Gaye, N., Magnaldo, T., Tanaka, K., Kisselev, A.F., Harel-Bellan, A., and Nakatani, Y. (2006). CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome

- pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev.* *20*, 1429–1434.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J.-I., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., and Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* *113*, 357–367.
- Groth, A., Corpet, A., Cook, A.J.L., Roche, D., Bartek, J., Lukas, J., and Almouzni, G. (2007a). Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science* *318*, 1928–1931.
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007b). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* *128*, 721–733.
- Guerrero-Santoro, J., Kapetanaki, M.G., Hsieh, C.L., Gorbachinsky, I., Levine, A.S., and Rapić-Otrin, V. (2008). The cullin 4B-based UV-damaged DNA-binding protein ligase binds to UV-damaged chromatin and ubiquitinates histone H2A. *Cancer Res.* *68*, 5014–5022.
- Guo, R., Chen, J., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2011). GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. *Nucleic Acids Res.* *39*, 1390–1397.
- Guo, R., Chen, J., Zhu, F., Biswas, A.K., Berton, T.R., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2010). E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* *285*, 19308–19315.
- Gurard-Levin, Z.A., Quivy, J.-P., and Almouzni, G. (2014). Histone chaperones: assisting histone traffic and nucleosome dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* *83*, 487–517.
- Hajkova, P., Ancelin, K., Waldmann, T., Lacoste, N., Lange, U.C., Cesari, F., Lee, C., Almouzni, G., Schneider, R., and Surani, M.A. (2008). Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* *452*, 877–881.
- Hake, S.B., Garcia, B.A., Duncan, E.M., Kauer, M., Delleire, G., Shabanowitz, J., Bazett-Jones, D.P., Allis, C.D., and Hunt, D.F. (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J. Biol. Chem.* *281*, 559–568.
- Hake, S.B., Garcia, B.A., Kauer, M., Baker, S.P., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Allis, C.D. (2005). Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 6344–6349.
- Halford, S., Wadey, R., Roberts, C., Daw, S.C., Whiting, J.A., O'Donnell, H., Dunham, I., Bentley, D., Lindsay, E., and Baldini, A. (1993). Isolation of a putative transcriptional regulator from the region of 22q11 deleted in DiGeorge syndrome, Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease. *Hum. Mol. Genet.* *2*, 2099–2107.
- Hamiche, A., and Shuaib, M. (2013). Chaperoning the histone H3 family. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 230–237.
- Han, J., Zhang, H., Zhang, H., Wang, Z., Zhou, H., and Zhang, Z. (2013). A Cul4 E3 Ubiquitin Ligase Regulates Histone Hand-Off during Nucleosome Assembly. *Cell* *155*, 817–829.
- Hanasoge, S., and Ljungman, M. (2007). H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis* *28*, 2298–2304.
- Hanawalt, P.C., and Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 958–970.

- Hara, R., Mo, J., and Sancar, A. (2000). DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease. *Molecular and Cellular Biology* 20, 9173–9181.
- Harada, A., Okada, S., Konno, D., Odawara, J., Yoshimi, T., Yoshimura, S., Kumamaru, H., Saiwai, H., Tsubota, T., Kurumizaka, H., et al. (2012). Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate. *Embo J.* 31, 2994–3007.
- Harshman, S.W., Young, N.L., Parthun, M.R., and Freitas, M.A. (2013). H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Res.* 41, 9593–9609.
- Hasan, S., Hassa, P.O., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2001). Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature* 410, 387–391.
- Heine, G.F., Horwitz, A.A., and Parvin, J.D. (2008). Multiple mechanisms contribute to inhibit transcription in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 283, 9555–9561.
- Heitz, E. (1928). *Das Heterochromatin der Moose*. Berlin: Bornträger.
- Hierck, B.P., Molin, D.G.M., Boot, M.J., Poelmann, R.E., and Gittenberger-de Groot, A.C. (2004). A chicken model for DGCR6 as a modifier gene in the DiGeorge critical region. *Pediatr. Res.* 56, 440–448.
- Hockberger, P.E. (2002). A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochem. Photobiol.* 76, 561–579.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374.
- Holliday, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238, 163–170.
- House, N.C.M., Koch, M.R., and Freudenreich, C.H. (2014). Chromatin modifications and DNA repair: beyond double-strand breaks. *Front Genet* 5, 296.
- Hödl, M., and Basler, K. (2009). Transcription in the absence of histone H3.3. *Curr. Biol.* 19, 1221–1226.
- Hödl, M., and Basler, K. (2012). Transcription in the absence of histone H3.2 and H3K4 methylation. *Curr. Biol.* 22, 2253–2257.
- Huang, H., Sabari, B.R., Garcia, B.A., Allis, C.D., and Zhao, Y. (2014). SnapShot: histone modifications. *Cell* 159, 458–458.e1.
- Huang, J.C., and Sancar, A. (1994). Determination of minimum substrate size for human excinuclease. *J. Biol. Chem.* 269, 19034–19040.
- Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., and Chu, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 424–428.
- Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., et al. (2007). DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Molecular and Cellular Biology* 27, 7028–7040.
- Ingouff, M., Rademacher, S., Holec, S., Soljić, L., Xin, N., Readshaw, A., Foo, S.H., Lahouze, B., Sprunck, S., and Berger, F. (2010). Zygotic resetting of the HISTONE 3 variant repertoire participates in epigenetic reprogramming in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 20, 2137–2143.

- Itoh, T., O'Shea, C., and Linn, S. (2003). Impaired regulation of tumor suppressor p53 caused by mutations in the xeroderma pigmentosum DDB2 gene: mutual regulatory interactions between p48(DDB2) and p53. *Molecular and Cellular Biology* 23, 7540–7553.
- Ivanauskienė, K., Delbarre, E., McGhie, J.D., Küntziger, T., Wong, L.H., and Collas, P. (2014). The PML-associated protein DEK regulates the balance of H3.3 loading on chromatin and is important for telomere integrity. *Genome Res.* 24, 1584–1594.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Jensen, A., and Mullenders, L.H.F. (2010). Transcription factor IIS impacts UV-inhibited transcription. *DNA Repair* 9, 1142–1150.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jha, D.K., and Strahl, B.D. (2014). An RNA polymerase II-coupled function for histone H3K36 methylation in checkpoint activation and DSB repair. *Nat Commun* 5, 3965.
- Jiang, Y., Wang, X., Bao, S., Guo, R., Johnson, D.G., Shen, X., and Li, L. (2010). INO80 chromatin remodeling complex promotes the removal of UV lesions by the nucleotide excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17274–17279.
- Jin, C., and Felsenfeld, G. (2007). Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.* 21, 1519–1529.
- Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., and Felsenfeld, G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.* 41, 941–945.
- Jullien, J., Astrand, C., Szenker, E., Garrett, N., Almouzni, G., and Gurdon, J. (2012). HIRA dependent H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes. *Epigenetics Chromatin* 5, 17.
- Kallappagoudar, S., Yadav, R.K., Lowe, B.R., and Partridge, J.F. (2015). Histone H3 mutations—a special role for H3.3 in tumorigenesis? *Chromosoma*.
- Kamiuchi, S., Saijo, M., Citterio, E., de Jager, M., Hoeijmakers, J.H.J., and Tanaka, K. (2002). Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 201–206.
- Kanoh, J., and Russell, P. (2000). Slm9, a novel nuclear protein involved in mitotic control in fission yeast. *Genetics* 155, 623–631.
- Kapetanaki, M.G., Guerrero-Santoro, J., Bisi, D.C., Hsieh, C.L., Rapić-Otrin, V., and Levine, A.S. (2006). The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2588–2593.
- Katsumi, S., Kobayashi, N., Imoto, K., Nakagawa, A., Yamashina, Y., Muramatsu, T., Shirai, T., Miyagawa, S., Sugiura, S., Hanaoka, F., et al. (2001). In situ visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1156–1161.
- Kaufman, P.D., Cohen, J.L., and Osley, M.A. (1998). Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I. *Molecular and Cellular Biology* 18, 4793–4806.

- Kebede, A.F., Schneider, R., and Daujat, S. (2014). Novel types and sites of histone modifications emerge as players in the transcriptional regulation contest. *Febs J.*
- Keeney, S., Eker, A.P., Brody, T., Vermeulen, W., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., and Linn, S. (1994). Correction of the DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group E by injection of a DNA damage-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4053–4056.
- Khuong-Quang, D.-A., Buczkowicz, P., Rakopoulos, P., Liu, X.-Y., Fontebasso, A.M., Bouffet, E., Bartels, U., Albrecht, S., Schwartzenruber, J., Letourneau, L., et al. (2012). K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol.* *124*, 439–447.
- Kim, J.K., Patel, D., and Choi, B.S. (1995). Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem. Photobiol.* *62*, 44–50.
- Kim, J.-A., and Haber, J.E. (2009). Chromatin assembly factors Asf1 and CAF-1 have overlapping roles in deactivating the DNA damage checkpoint when DNA repair is complete. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 1151–1156.
- Kimura, H., and Cook, P.R. (2001). Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J. Cell Biol.* *153*, 1341–1353.
- Kimura, H. (2005). Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching. *DNA Repair* *4*, 939–950.
- Klochender-Yeivin, A., Picarsky, E., and Yaniv, M. (2006). Increased DNA damage sensitivity and apoptosis in cells lacking the Snf5/Ini1 subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Molecular and Cellular Biology* *26*, 2661–2674.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* *184*, 868–871.
- Kornberg, R.D. (1977). Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* *46*, 931–954.
- Kossel, A. (1884). Über einen peptoartigen Bestandteil des Zellkern. *Z. Physiol. Chem* *8*, 511–515.
- Kraemer, K.H., Patronas, N.J., Schiffmann, R., Brooks, B.P., Tamura, D., and DiGiovanna, J.J. (2007). Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* *145*, 1388–1396.
- Krimer, D.B., Cheng, G., and Skoultchi, A.I. (1993). Induction of H3.3 replacement histone mRNAs during the precommitment period of murine erythroleukemia cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* *21*, 2873–2879.
- Kulaksiz, G., Reardon, J.T., and Sancar, A. (2005). Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. *Molecular and Cellular Biology* *25*, 9784–9792.
- Kuo, W.-H.W., Wang, Y., Wong, R.P.C., Campos, E.I., and Li, G. (2007). The ING1b tumor suppressor facilitates nucleotide excision repair by promoting chromatin accessibility to XPA. *Exp. Cell Res.* *313*, 1628–1638.
- Kuraoka, I., Ito, S., Wada, T., Hayashida, M., Lee, L., Saijo, M., Nakatsu, Y., Matsumoto, M., Matsunaga, T., Handa, H., et al. (2008). Isolation of XAB2 complex involved in pre-mRNA splicing, transcription, and transcription-coupled repair. *J. Biol. Chem.* *283*, 940–950.

- Kusumoto, R., Masutani, C., Sugasawa, K., Iwai, S., Araki, M., Uchida, A., Mizukoshi, T., and Hanaoka, F. (2001). Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro. *Mutat. Res.* *485*, 219–227.
- Lacoste, N., Woolfe, A., Tachiwana, H., Garea, A.V., Barth, T., Cantaloube, S., Kurumizaka, H., Imhof, A., and Almouzni, G. (2014). Mislocalization of the centromeric histone variant CenH3/CENP-A in human cells depends on the chaperone DAXX. *Molecular Cell* *53*, 631–644.
- Lamour, V., Lécluse, Y., Desmaze, C., Spector, M., Bodescot, M., Aurias, A., Osley, M.A., and Lipinski, M. (1995). A human homolog of the *S. cerevisiae* HIR1 and HIR2 transcriptional repressors cloned from the DiGeorge syndrome critical region. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 791–799.
- Lan, L., Nakajima, S., Kapetanaki, M.G., Hsieh, C.L., Fagerburg, M., Thickman, K., Rodriguez-Collazo, P., Leuba, S.H., Levine, A.S., and Rapić-Otrin, V. (2012). Monoubiquitinated histone H2A destabilizes photolesion-containing nucleosomes with concomitant release of UV-damaged DNA-binding protein E3 ligase. *J. Biol. Chem.* *287*, 12036–12049.
- Lan, L., Ui, A., Nakajima, S., Hatakeyama, K., Hoshi, M., Watanabe, R., Janicki, S.M., Ogiwara, H., Kohno, T., Kanno, S.-I., et al. (2010). The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Molecular Cell* *40*, 976–987.
- Lange, S.S., Mitchell, D.L., and Vasquez, K.M. (2008). High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 10320–10325.
- Latreille, D., Bluy, L., Benkirane, M., and Kiernan, R.E. (2014). Identification of histone 3 variant 2 interacting factors. *Nucleic Acids Res.* *42*, 3542–3550.
- Lemaître, C., and Soutoglou, E. (2014). Double strand break (DSB) repair in heterochromatin and heterochromatin proteins in DSB repair. *DNA Repair* *19*, 163–168.
- Levy, M.A., Kernohan, K.D., Jiang, Y., and Bérubé, N.G. (2015). ATRX promotes gene expression by facilitating transcriptional elongation through guanine-rich coding regions. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 1824–1835.
- Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Noh, K.-M., Stadler, S.C., and Allis, C.D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 14075–14080.
- Lewis, P.W., Müller, M.M., Koletsky, M.S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L.A., Garcia, B.A., Muir, T.W., Becher, O.J., and Allis, C.D. (2013). Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* *340*, 857–861.
- Li, F., Mao, G., Tong, D., Huang, J., Gu, L., Yang, W., and Li, G.-M. (2013). The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSa. *Cell* *153*, 590–600.
- Li, J., Wang, Q.-E., Zhu, Q., El-Mahdy, M.A., Wani, G., Praetorius-Ibba, M., and 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.
- Li, S. (2012). Implication of posttranslational histone modifications in nucleotide excision repair. *Int J Mol Sci* *13*, 12461–12486.
- Lim, C.Y., Reversade, B., Knowles, B.B., and Solter, D. (2013). Optimal histone H3 to linker histone H1 chromatin ratio is vital for mesodermal competence in *Xenopus*. *Development* *140*, 853–860.

- Lim, J.-H., West, K.L., Rubinstein, Y., Bergel, M., Postnikov, Y.V., and Bustin, M. (2005). Chromosomal protein HMGN1 enhances the acetylation of lysine 14 in histone H3. *Embo J.* *24*, 3038–3048.
- Lin, C.-J., Koh, F.M., Wong, P., Conti, M., and Ramalho-Santos, M. (2014). Hira-mediated H3.3 incorporation is required for DNA replication and ribosomal RNA transcription in the mouse zygote. *Dev. Cell* *30*, 268–279.
- Lindsay, E.A., Botta, A., Jurecic, V., Carattini-Rivera, S., Cheah, Y.C., Rosenblatt, H.M., Bradley, A., and Baldini, A. (1999). Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature* *401*, 379–383.
- Liu, C.-P., Xiong, C., Wang, M., Yu, Z., Yang, N., Chen, P., Zhang, Z., Li, G., and Xu, R.-M. (2012). Structure of the variant histone H3.3-H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1287–1292.
- Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurençon, A., Karr, T.L., and Couble, P. (2005). The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature* *437*, 1386–1390.
- Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A., and Almouzni, G. (2006). PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Molecular Cell* *24*, 309–316.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251–260.
- Luijsterburg, M.S., Dinant, C., Lans, H., Stap, J., Wiernasz, E., Lagerwerf, S., Warmerdam, D.O., Lindh, M., Brink, M.C., Dobrucki, J.W., et al. (2009). Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J. Cell Biol.* *185*, 577–586.
- Luijsterburg, M.S., Lindh, M., Acs, K., Vrouwe, M.G., Pines, A., van Attikum, H., Mullenders, L.H., and Dantuma, N.P. (2012). DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J. Cell Biol.* *197*, 267–281.
- MacAlpine, D.M., and Almouzni, G. (2013). Chromatin and DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*, a010207.
- Mackinnon-Roy, C., Stubbert, L.J., and McKay, B.C. (2011). RNA interference against transcription elongation factor SII does not support its role in transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mutat. Res.* *706*, 53–58.
- Maicher, A., Lockhart, A., and Luke, B. (2014). Breaking new ground: digging into TERRA function. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 387–394.
- Majumder, A., Mohieddin, S.K., Joseph, S., Scambler, P.J., and Dutta, D. (2015). Histone chaperone HIRA in regulation of transcription factor RUNX1. *J. Biol. Chem.*
- Malay, A.D., Umehara, T., Matsubara-Malay, K., Padmanabhan, B., and Yokoyama, S. (2008). Crystal structures of fission yeast histone chaperone Asf1 complexed with the Hip1 B-domain or the Cac2 C terminus. *J. Biol. Chem.* *283*, 14022–14031.
- Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 882–891.
- Marietta, C., and Brooks, P.J. (2007). Transcriptional bypass of bulky DNA lesions causes new mutant RNA transcripts in human cells. *EMBO Rep.* *8*, 388–393.

- Marteijn, J.A., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lans, H., Schwertman, P., Gourdin, A.M., Dantuma, N.P., Lukas, J., and Vermeulen, W. (2009). Nucleotide excision repair-induced H2A ubiquitination is dependent on MDC1 and RNF8 and reveals a universal DNA damage response. *J. Cell Biol.* *186*, 835–847.
- Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H.J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 465–481.
- Marti, T.M., Hefner, E., Feeney, L., Natale, V., and Cleaver, J.E. (2006). H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9891–9896.
- Martinez, E., Palhan, V.B., Tjernberg, A., Lymar, E.S., Gamper, A.M., Kundu, T.K., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2001). Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Molecular and Cellular Biology* *21*, 6782–6795.
- Martini, E., Roche, D.M., Marheineke, K., Verreault, A., and Almouzni, G. (1998). Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *J. Cell Biol.* *143*, 563–575.
- Marzluff, W.F., Gongidi, P., Woods, K.R., Jin, J., and Maltais, L.J. (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* *80*, 487–498.
- Marzluff, W.F., Wagner, E.J., and Duronio, R.J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 843–854.
- Masutani, C., Sugasawa, K., Yanagisawa, J., Sonoyama, T., Ui, M., Enomoto, T., Takio, K., Tanaka, K., van der Spek, P.J., and Bootsma, D. (1994). Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *Embo J.* *13*, 1831–1843.
- Mathis, G.A., and Althaus, F.R. (1990). Isolation of 8-methoxypsoralen accessible DNA domains from chromatin of intact cells. *Cell Biol. Toxicol.* *6*, 35–45.
- Matsumoto, M., Yaginuma, K., Igarashi, A., Imura, M., Hasegawa, M., Iwabuchi, K., Date, T., Mori, T., Ishizaki, K., Yamashita, K., et al. (2007). Perturbed gap-filling synthesis in nucleotide excision repair causes histone H2AX phosphorylation in human quiescent cells. *Journal of Cell Science* *120*, 1104–1112.
- Matsumoto, S., Fischer, E.S., Yasuda, T., Dohmae, N., Iwai, S., Mori, T., Nishi, R., Yoshino, K.-I., Sakai, W., Hanaoka, F., et al. (2015). Functional regulation of the DNA damage-recognition factor DDB2 by ubiquitination and interaction with xeroderma pigmentosum group C protein. *Nucleic Acids Res.* *43*, 1700–1713.
- Mayne, L.V., and Lehmann, A.R. (1982). Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum. *Cancer Res.* *42*, 1473–1478.
- Maze, I., Noh, K.-M., Soshnev, A.A., and Allis, C.D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 259–271.
- McBryant, S.J., Adams, V.H., and Hansen, J.C. (2006). Chromatin architectural proteins. *Chromosome Res.* *14*, 39–51.

- McGhee, J.D., and Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* *49*, 1115–1156.
- McKenna, E.S., Sansam, C.G., Cho, Y.-J., Greulich, H., Evans, J.A., Thom, C.S., Moreau, L.A., Biegel, J.A., Pomeroy, S.L., and Roberts, C.W.M. (2008). Loss of the epigenetic tumor suppressor SNF5 leads to cancer without genomic instability. *Molecular and Cellular Biology* *28*, 6223–6233.
- McKittrick, E., Gafken, P.R., Ahmad, K., and Henikoff, S. (2004). Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1525–1530.
- Mello, J.A., Silljé, H.H.W., Roche, D.M.J., Kirschner, D.B., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2002). Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep.* *3*, 329–334.
- Michaelson, J.S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C., and Leder, P. (1999). Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev.* *13*, 1918–1923.
- Michod, D., Bartesaghi, S., Khelifi, A., Bellodi, C., Berliocchi, L., Nicotera, P., and Salomoni, P. (2012). Calcium-dependent dephosphorylation of the histone chaperone DAXX regulates H3.3 loading and transcription upon neuronal activation. *Neuron* *74*, 122–135.
- Min, J.-H., and Pavletich, N.P. (2007). Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature* *449*, 570–575.
- Mitchell, D.L., Haipek, C.A., and Clarkson, J.M. (1985). (6-4)Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat. Res.* *143*, 109–112.
- Mitchell, D.L., Nguyen, T.D., and Cleaver, J.E. (1990). Nonrandom induction of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts in ultraviolet-irradiated human chromatin. *J. Biol. Chem.* *265*, 5353–5356.
- Mito, Y., Henikoff, J.G., and Henikoff, S. (2005). Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat. Genet.* *37*, 1090–1097.
- Moggs, J.G., and Almouzni, G. (1999). Chromatin rearrangements during nucleotide excision repair. *Biochimie* *81*, 45–52.
- Moggs, J.G., Grandi, P., Quivy, J.P., Jónsson, Z.O., Hübscher, U., Becker, P.B., and Almouzni, G. (2000). A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Molecular and Cellular Biology* *20*, 1206–1218.
- Moné, M.J., Volker, M., Nikaido, O., Mullenders, L.H., van Zeeland, A.A., Verschure, P.J., Manders, E.M., and van Driel, R. (2001). Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Rep.* *2*, 1013–1017.
- Moser, J., Volker, M., Kool, H., Alekseev, S., Vrieling, H., Yasui, A., Van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H.F. (2005). The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA Repair* *4*, 571–582.
- Mourgues, S., Gautier, V., Lagarou, A., Bordier, C., Mourcet, A., Slingerland, J., Kaddoum, L., Coin, F., Vermeulen, W., Gonzales de Peredo, A., et al. (2013). ELL, a novel TFIIH partner, is involved in transcription restart after DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 17927–17932.
- Muthurajan, U.M., Hepler, M.R.D., Hieb, A.R., Clark, N.J., Kramer, M., Yao, T., and Luger, K.

- (2014). Automodification switches PARP-1 function from chromatin architectural protein to histone chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 12752–12757.
- Nakatsu, Y., Asahina, H., Citterio, E., Rademakers, S., Vermeulen, W., Kamiuchi, S., Yeo, J.P., Khaw, M.C., Saijo, M., Kodo, N., et al. (2000). XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J. Biol. Chem.* *275*, 34931–34937.
- Nakazawa, Y., Yamashita, S., Lehmann, A.R., and Ogi, T. (2010). A semi-automated non-radioactive system for measuring recovery of RNA synthesis and unscheduled DNA synthesis using ethynyluracil derivatives. *DNA Repair* *9*, 506–516.
- Nechemia-Arbely, Y., Fachinetti, D., and Cleveland, D.W. (2012). Replicating centromeric chromatin: spatial and temporal control of CENP-A assembly. *Exp. Cell Res.* *318*, 1353–1360.
- Newhart, A., Rafalska-Metcalf, I.U., Yang, T., Joo, L.M., Powers, S.L., Kossenkov, A.V., Lopez-Jones, M., Singer, R.H., Showe, L.C., Skordalakes, E., et al. (2013). Single cell analysis of RNA-mediated histone H3.3 recruitment to a cytomegalovirus promoter-regulated transcription site. *J. Biol. Chem.* *288*, 19882–19899.
- Ng, J.M.Y., Vermeulen, W., van der Horst, G.T.J., Bergink, S., Sugawara, K., Vrieling, H., and Hoeijmakers, J.H.J. (2003). A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev.* *17*, 1630–1645.
- Ng, R.K., and Gurdon, J.B. (2008). Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat. Cell Biol.* *10*, 102–109.
- Nie, X., Wang, H., Li, J., Holec, S., and Berger, F. (2014). The HIRA complex that deposits the histone H3.3 is conserved in Arabidopsis and facilitates transcriptional dynamics. *Biol Open* *3*, 794–802.
- Niedernhofer, L.J., Bohr, V.A., Sander, M., and Kraemer, K.H. (2011). Xeroderma pigmentosum and other diseases of human premature aging and DNA repair: molecules to patients. *Mech. Ageing Dev.* *132*, 340–347.
- Nishi, R., Okuda, Y., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Masutani, C., Sugawara, K., and Hanaoka, F. (2005). Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Molecular and Cellular Biology* *25*, 5664–5674.
- Nishibuchi, I., Suzuki, H., Kinomura, A., Sun, J., Liu, N.-A., Horikoshi, Y., Shima, H., Kusakabe, M., Harata, M., Fukagawa, T., et al. (2014). Reorganization of Damaged Chromatin by the Exchange of Histone Variant H2A.Z-2. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *89*, 736–744.
- Noh, K.-M., Maze, I., Zhao, D., Xiang, B., Wenderski, W., Lewis, P.W., Shen, L., Li, H., and Allis, C.D. (2014). ATRX tolerates activity-dependent histone H3 methyl/phos switching to maintain repetitive element silencing in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Nourani, A., Robert, F., and Winston, F. (2006). Evidence that Spt2/Sin1, an HMG-like factor, plays roles in transcription elongation, chromatin structure, and genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *26*, 1496–1509.
- Nospikel, T. (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci.* *66*, 994–1009.
- Nospikel, T. (2011). Multiple roles of ubiquitination in the control of nucleotide excision repair. *Mech. Ageing Dev.* *132*, 355–365.

- O'Hagan, H.M., Mohammad, H.P., and Baylin, S.B. (2008). Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet.* *4*, e1000155.
- O'Hagan, H.M., Wang, W., Sen, S., Destefano Shields, C., Lee, S.S., Zhang, Y.W., Clements, E.G., Cai, Y., Van Neste, L., Easwaran, H., et al. (2011). Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell* *20*, 606–619.
- Oh, K.-S., Bustin, M., Mazur, S.J., Appella, E., and Kraemer, K.H. (2011a). UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells. *DNA Repair* *10*, 5–15.
- Oh, K.-S., Emmert, S., Tamura, D., DiGiovanna, J.J., and Kraemer, K.H. (2011b). Multiple skin cancers in adults with mutations in the XP-E (DDB2) DNA repair gene. *J. Invest. Dermatol.* *131*, 785–788.
- Oh, K.-S., Imoto, K., Emmert, S., Tamura, D., DiGiovanna, J.J., and Kraemer, K.H. (2011c). Nucleotide excision repair proteins rapidly accumulate but fail to persist in human XP-E (DDB2 mutant) cells. *Photochem. Photobiol.* *87*, 729–733.
- Oksenysh, V., Zhovmer, A., Ziani, S., Mari, P.-O., Eberova, J., Nardo, T., Stefanini, M., Giglia-Mari, G., Egly, J.-M., and Coin, F. (2013). Histone Methyltransferase DOT1L Drives Recovery of Gene Expression after a Genotoxic Attack. *PLoS Genet.* *9*, e1003611.
- Okuda, Y., Nishi, R., Ng, J.M.Y., Vermeulen, W., van der Horst, G.T.J., Mori, T., Hoeijmakers, J.H.J., Hanaoka, F., and Sugawara, K. (2004). Relative levels of the two mammalian Rad23 homologs determine composition and stability of the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair* *3*, 1285–1295.
- Olins, D.E., and Olins, A.L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 809–814.
- Orsi, G.A., Algazeery, A., Meyer, R.E., Capri, M., Sapey-Triomphe, L.M., Horard, B., Gruffat, H., Couble, P., Aït-Ahmed, O., and Loppin, B. (2013). Drosophila Yemanuclein and HIRA cooperate for de novo assembly of H3.3-containing nucleosomes in the male pronucleus. *PLoS Genet.* *9*, e1003285.
- Osley, M.A. (1991). The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* *60*, 827–861.
- Osley, M.A., and Lycan, D. (1987). Trans-acting regulatory mutations that alter transcription of *Saccharomyces cerevisiae* histone genes. *Molecular and Cellular Biology* *7*, 4204–4210.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* *4*, 281–300.
- Pai, C.-C., Deegan, R.S., Subramanian, L., Gal, C., Sarkar, S., Blaikley, E.J., Walker, C., Hulme, L., Bernhard, E., Codlin, S., et al. (2014). A histone H3K36 chromatin switch coordinates DNA double-strand break repair pathway choice. *Nat Commun* *5*, 4091.
- Papamichos-Chronakis, M., and Peterson, C.L. (2013). Chromatin and the genome integrity network. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 62–75.
- Park, H., Zhang, K., Ren, Y., Nadji, S., Sinha, N., Taylor, J.S., and Kang, C. (2002). Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 15965–15970.

- Pattison, D.I., and Davies, M.J. (2006). Actions of ultraviolet light on cellular structures. *Exs* 131–157.
- Pchelintsev, N.A., McBryan, T., Rai, T.S., van Tuyn, J., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Adams, P.D. (2013). Placing the HIRA histone chaperone complex in the chromatin landscape. *Cell Rep* 3, 1012–1019.
- Pehrson, J.R. (1995). Probing the conformation of nucleosome linker DNA in situ with pyrimidine dimer formation. *J. Biol. Chem.* 270, 22440–22444.
- Peterson, C.L., and Almouzni, G. (2013). Nucleosome dynamics as modular systems that integrate DNA damage and repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Pfister, S.X., Ahrabi, S., Zalmas, L.-P., Sarkar, S., Aymard, F., Bachrati, C.Z., Helleday, T., Legube, G., La Thangue, N.B., Porter, A.C.G., et al. (2014). SETD2-Dependent Histone H3K36 Trimethylation Is Required for Homologous Recombination Repair and Genome Stability. *Cell Rep* 7, 2006–2018.
- Phelps-Durr, T.L., Thomas, J., Vahab, P., and Timmermans, M.C.P. (2005). Maize rough sheath2 and its Arabidopsis orthologue ASYMMETRIC LEAVES1 interact with HIRA, a predicted histone chaperone, to maintain knox gene silencing and determinacy during organogenesis. *Plant Cell* 17, 2886–2898.
- Pines, A., Vrouwe, M.G., Marteiijn, J.A., Typas, D., Luijsterburg, M.S., Cansoy, M., Hensbergen, P., Deelder, A., de Groot, A., Matsumoto, S., et al. (2012). PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J. Cell Biol.* 199, 235–249.
- Piña, B., and Suau, P. (1987). Changes in histones H2A and H3 variant composition in differentiating and mature rat brain cortical neurons. *Dev. Biol.* 123, 51–58.
- Placek, B.J., Huang, J., Kent, J.R., Dorsey, J., Rice, L., Fraser, N.W., and Berger, S.L. (2009). The histone variant H3.3 regulates gene expression during lytic infection with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 83, 1416–1421.
- Polo, S.E. (2015). Reshaping Chromatin after DNA Damage: The Choreography of Histone Proteins. *J. Mol. Biol.* 427, 626–636.
- Polo, S.E., Roche, D., and Almouzni, G. (2006). New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* 127, 481–493.
- Postnikov, Y.V., Kurahashi, T., Zhou, M., and Bustin, M. (2012). The nucleosome binding protein HMGN1 interacts with PCNA and facilitates its binding to chromatin. *Molecular and Cellular Biology* 32, 1844–1854.
- Povlsen, L.K., Beli, P., Wagner, S.A., Poulsen, S.L., Sylvestersen, K.B., Poulsen, J.W., Nielsen, M.L., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., and Choudhary, C. (2012). Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass. *Nat. Cell Biol.* 14, 1089–1098.
- Price, B.D., and D'Andrea, A.D. (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* 152, 1344–1354.
- Prochasson, P., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2005). The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF. *Genes Dev.* 19, 2534–2539.
- Qian, M.-X., Pang, Y., Liu, C.H., Haratake, K., Du, B.-Y., Ji, D.-Y., Wang, G.-F., Zhu, Q.-Q., Song,

- W., Yu, Y., et al. (2013). Acetylation-Mediated Proteasomal Degradation of Core Histones during DNA Repair and Spermatogenesis. *Cell* 153, 1012–1024.
- Qian, Z., Huang, H., Hong, J.Y., Burck, C.L., Johnston, S.D., Berman, J., Carol, A., and Liebman, S.W. (1998). Yeast Ty1 retrotransposition is stimulated by a synergistic interaction between mutations in chromatin assembly factor I and histone regulatory proteins. *Molecular and Cellular Biology* 18, 4783–4792.
- Rai, T.S., Cole, J.J., Nelson, D.M., Dikovskaya, D., Faller, W.J., Vizioli, M.G., Hewitt, R.N., Anannya, O., McBryan, T., Manoharan, I., et al. (2014). HIRA orchestrates a dynamic chromatin landscape in senescence and is required for suppression of neoplasia. *Genes Dev.* 28, 2712–2725.
- Rai, T.S., Puri, A., McBryan, T., Hoffman, J., Tang, Y., Pchelintsev, N.A., van Tuyn, J., Marmorstein, R., Schultz, D.C., and Adams, P.D. (2011). Human CABIN1 is a functional member of the human HIRA/UBN1/ASF1a histone H3.3 chaperone complex. *Molecular and Cellular Biology* 31, 4107–4118.
- Rajagopalan, S., Nepa, J., and Venkatachalam, S. (2012). Chromodomain helicase DNA-binding protein 2 affects the repair of X-ray and UV-induced DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* 53, 44–50.
- Ramanathan, B., and Smerdon, M.J. (1986). Changes in nuclear protein acetylation in u.v.-damaged human cells. *Carcinogenesis* 7, 1087–1094.
- Ramanathan, B., and Smerdon, M.J. (1989). Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *J. Biol. Chem.* 264, 11026–11034.
- Rando, O.J. (2012). Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 148–155.
- Rapić-Otrin, V., McLenigan, M.P., Bisi, D.C., Gonzalez, M., and Levine, A.S. (2002). Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation. *Nucleic Acids Res.* 30, 2588–2598.
- Rapić-Otrin, V., Navazza, V., Nardo, T., Botta, E., McLenigan, M., Bisi, D.C., Levine, A.S., and Stefanini, M. (2003). True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1507–1522.
- Ravanat, J.L., Douki, T., and Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 63, 88–102.
- Ray, A., Mir, S.N., Wani, G., Zhao, Q., Battu, A., Zhu, Q., Wang, Q.-E., and Wani, A.A. (2009). Human SNF5/INI1, a component of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex, promotes nucleotide excision repair by influencing ATM recruitment and downstream H2AX phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 29, 6206–6219.
- Ray-Gallet, D., Quivy, J.-P., Scamps, C., Martini, E.M.-D., Lipinski, M., and Almouzni, G. (2002). HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Molecular Cell* 9, 1091–1100.
- Ray-Gallet, D., Woolfe, A., Vassias, I., Pellentz, C., Lacoste, N., Puri, A., Schultz, D.C., Pchelintsev, N.A., Adams, P.D., Jansen, L.E.T., et al. (2011). Dynamics of histone h3 deposition in vivo reveal a nucleosome gap-filling mechanism for h3.3 to maintain chromatin integrity. *Molecular Cell* 44, 928–941.

- Razin, S.V., and Gavrilov, A.A. (2014). Chromatin without the 30-nm fiber: constrained disorder instead of hierarchical folding. *Epigenetics* 9, 653–657.
- Reed, S.H. (2011). Nucleotide excision repair in chromatin: damage removal at the drop of a HAT. *DNA Repair* 10, 734–742.
- Reines, D., Ghanouni, P., Gu, W., Mote, J., and Powell, W. (1993). Transcription elongation by RNA polymerase II: mechanism of SII activation. *Cell. Mol. Biol. Res.* 39, 331–338.
- Revet, I., Feeney, L., Bruguera, S., Wilson, W., Dong, T.K., Oh, D.H., Dankort, D., and Cleaver, J.E. (2011). Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8663–8667.
- Richet, N., Liu, D., Legrand, P., Velours, C., Corpet, A., Gaubert, A., Bakail, M., Moal-Raisin, G., Guerois, R., Compper, C., et al. (2015). Structural insight into how the human helicase subunit MCM2 may act as a histone chaperone together with ASF1 at the replication fork. *Nucleic Acids Res.* 43, 1905–1917.
- Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311, 532–537.
- Richmond, T.J., and Davey, C.A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145–150.
- Ridgway, P., and Almouzni, G. (2000). CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair. *Journal of Cell Science* 113 (Pt 15), 2647–2658.
- Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J.-M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J.* 22, 5293–5303.
- Ritchie, K., Seah, C., Moulin, J., Isaac, C., Dick, F., and Bérubé, N.G. (2008). Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects. *J. Cell Biol.* 180, 315–324.
- Roberts, C., Sutherland, H.F., Farmer, H., Kimber, W., Halford, S., Carey, A., Brickman, J.M., Wynshaw-Boris, A., and Scambler, P.J. (2002). Targeted mutagenesis of the Hira gene results in gastrulation defects and patterning abnormalities of mesoendodermal derivatives prior to early embryonic lethality. *Molecular and Cellular Biology* 22, 2318–2328.
- Rockx, D.A., Mason, R., van Hoffen, A., Barton, M.C., Citterio, E., Bregman, D.B., van Zeeland, A.A., Vrieling, H., and Mullenders, L.H. (2000). UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10503–10508.
- Rogers, R.S., Inselman, A., Handel, M.A., and Matunis, M.J. (2004). SUMO modified proteins localize to the XY body of pachytene spermatocytes. *Chromosoma* 113, 233–243.
- Rothbart, S.B., and Strahl, B.D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 627–643.
- Rubbi, C.P., and Milner, J. (2003). p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J.* 22, 975–986.
- Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., and Riggs, A.D. (1996). *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*.
- Saade, E., Pirozhkova, I., Aimbetov, R., Lipinski, M., and Ogryzko, V. (2015). Molecular turnover,

the H3.3 dilemma and organismal aging (hypothesis). *Aging Cell* 14, 322–333.

Sakai, A., Schwartz, B.E., Goldstein, S., and Ahmad, K. (2009). Transcriptional and developmental functions of the H3.3 histone variant in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 19, 1816–1820.

Sale, J.E., Lehmann, A.R., and Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 141–152.

Sancar, G.B. (2000). Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutat. Res.* 451, 25–37.

Sarai, N., Nimura, K., Tamura, T., Kanno, T., Patel, M.C., Heightman, T.D., Ura, K., and Ozato, K. (2013). WHSC1 links transcription elongation to HIRA-mediated histone H3.3 deposition. *Embo J.* 32, 2392–2406.

Sarkar, S., Kiely, R., and McHugh, P.J. (2010). The Ino80 chromatin-remodeling complex restores chromatin structure during UV DNA damage repair. *J. Cell Biol.* 191, 1061–1068.

Sawatsubashi, S., Murata, T., Lim, J., Fujiki, R., Ito, S., Suzuki, E., Tanabe, M., Zhao, Y., Kimura, S., Fujiyama, S., et al. (2010). A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes Dev.* 24, 159–170.

Sánchez-Molina, S., Mortusewicz, O., Bieber, B., Auer, S., Eckey, M., Leonhardt, H., Friedl, A.A., and Becker, P.B. (2011). Role for hACF1 in the G2/M damage checkpoint. *Nucleic Acids Res.* 39, 8445–8456.

Schinke, M., and Izumo, S. (1999). Getting to the heart of DiGeorge syndrome. *Nat. Med.* 5, 1120–1121.

Schneiderman, J.I., Orsi, G.A., Hughes, K.T., Loppin, B., and Ahmad, K. (2012). Nucleosome-depleted chromatin gaps recruit assembly factors for the H3.3 histone variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 19721–19726.

Schotta, G., Sengupta, R., Kubicek, S., Malin, S., Kauer, M., Callén, E., Celeste, A., Pagani, M., Opravil, S., La Rosa-Velazquez, De, I.A., et al. (2008). A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev.* 22, 2048–2061.

Schübeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature* 517, 321–326.

Schwartz, B.E., and Ahmad, K. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev.* 19, 804–814.

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482, 226–231.

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

Schwertman, P., Vermeulen, W., and Marteijn, J.A. (2013). UVSSA and USP7, a new couple in transcription-coupled DNA repair. *Chromosoma* 122, 275–284.

Scrima, A., Koníčková, R., Czyzewski, B.K., Kawasaki, Y., Jeffrey, P.D., Groisman, R., Nakatani, Y., Iwai, S., Pavletich, N.P., and Thomä, N.H. (2008). Structural basis of UV DNA-damage recognition

by the DDB1-DDB2 complex. *Cell* 135, 1213–1223.

Sen, S.P., and De Benedetti, A. (2006). TLK1B promotes repair of UV-damaged DNA through chromatin remodeling by Asf1. *BMC Mol. Biol.* 7, 37.

Sertic, S., Pizzi, S., Lazzaro, F., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2012). NER and DDR: classical music with new instruments. *Cell Cycle* 11, 668–674.

Sharp, J.A., Franco, A.A., Osley, M.A., and Kaufman, P.D. (2002). Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 16, 85–100.

Shaytan, A.K., Landsman, D., and Panchenko, A.R. (2015). Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A-H2B dimers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 32C, 48–57.

Shi, L., Wang, J., Hong, F., Spector, D.L., and Fang, Y. (2011). Four amino acids guide the assembly or disassembly of Arabidopsis histone H3.3-containing nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10574–10578.

Shimada, M., Haruta, M., Niida, H., Sawamoto, K., and Nakanishi, M. (2010). Protein phosphatase 1 γ is responsible for dephosphorylation of histone H3 at Thr 11 after DNA damage. *EMBO Rep.* 11, 883–889.

Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D.H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., and Nakanishi, M. (2008). Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* 132, 221–232.

Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844–847.

Shu, H., Nakamura, M., Siretskiy, A., Borghi, L., Moraes, I., Wildhaber, T., Grussem, W., and Hennig, L. (2014). Arabidopsis replacement histone variant H3.3 occupies promoters of regulated genes. *Genome Biol.* 15, R62.

Sigurdsson, S., Dirac-Svejstrup, A.B., and Svejstrup, J.Q. (2010). Evidence that transcript cleavage is essential for RNA polymerase II transcription and cell viability. *Molecular Cell* 38, 202–210.

Smeenk, G., and van Attikum, H. (2013). The chromatin response to DNA breaks: leaving a mark on genome integrity. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 55–80.

Smerdon, M.J. (1991). DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 422–428.

Smerdon, M.J., and Lieberman, M.W. (1978). Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA-repair synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4238–4241.

Smerdon, M.J., and Lieberman, M.W. (1980). Distribution within chromatin of deoxyribonucleic acid repair synthesis occurring at different times after ultraviolet radiation. *Biochemistry* 19, 2992–3000.

Song, T.-Y., Yang, J.-H., Park, J.-Y., Song, Y., Han, J.-W., Youn, H.-D., and Cho, E.-J. (2012). The role of histone chaperones in osteoblastic differentiation of C2C12 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 726–732.

Soria, G., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2012). Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Molecular Cell* 46, 722–734.

Spivak, G., and Ganesan, A.K. (2014). The complex choreography of transcription-coupled repair.

DNA Repair 19, 64–70.

Stiff, T., Walker, S.A., Cerosaletti, K., Goodarzi, A.A., Petermann, E., Concannon, P., O'Driscoll, M., and Jeggo, P.A. (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *Embo J.* 25, 5775–5782.

Stroud, H., Otero, S., Desvoyes, B., Ramírez-Parra, E., Jacobsen, S.E., and Gutierrez, C. (2012). Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5370–5375.

Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D.-A., Jones, D.T.W., Konermann, C., Pfaff, E., Tönjes, M., Sill, M., Bender, S., et al. (2012). Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell* 22, 425–437.

Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Molecular Cell* 2, 223–232.

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

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

Suquet, C., Mitchell, D.L., and Smerdon, M.J. (1995). Repair of UV-induced (6-4) photoproducts in nucleosome core DNA. *J. Biol. Chem.* 270, 16507–16509.

Svejstrup, J.Q. (2010). The interface between transcription and mechanisms maintaining genome integrity. *Trends Biochem. Sci.* 35, 333–338.

Swygert, S.G., and Peterson, C.L. (2014). Chromatin dynamics: interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 728–736.

Szenker, E., Boyarchuk, E., and Almouzni, G. (2013). Properties and Functions of Histone Variants. In *Fundamentals of Chromatin*, (New York, NY: Springer New York), pp. 375–426.

Szenker, E., Lacoste, N., and Almouzni, G. (2012). A developmental requirement for HIRA-dependent H3.3 deposition revealed at gastrulation in *Xenopus*. *Cell Rep* 1, 730–740.

Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res.* 21, 421–434.

Tachiwana, H., Osakabe, A., Shiga, T., Miya, Y., Kimura, H., Kagawa, W., and Kurumizaka, H. (2011). Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 578–583.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51–61.

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

- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2014). Environmental responses mediated by histone variants. *Trends Cell Biol.* *24*, 642–650.
- Tamura, T., Smith, M., Kanno, T., Dasenbrock, H., Nishiyama, A., and Ozato, K. (2009). Inducible deposition of the histone variant H3.3 in interferon-stimulated genes. *J. Biol. Chem.* *284*, 12217–12225.
- Tanaka, K., Kawai, K., Kumahara, Y., Ikenaga, M., and Okada, Y. (1981). Genetic complementation groups in cockayne syndrome. *Somatic Cell Genet.* *7*, 445–455.
- Tang, J.Y., Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., and Chu, G. (2000). Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. *Molecular Cell* *5*, 737–744.
- Tang, M.C.W., Jacobs, S.A., Mattiske, D.M., Soh, Y.M., Graham, A.N., Tran, A., Lim, S.L., Hudson, D.F., Kalitsis, P., O'Bryan, M.K., et al. (2015). Contribution of the two genes encoding histone variant h3.3 to viability and fertility in mice. *PLoS Genet.* *11*, e1004964.
- Tang, M.C.W., Jacobs, S.A., Wong, L.H., and Mann, J.R. (2013). Conditional allelic replacement applied to genes encoding the histone variant H3.3 in the mouse. *Genesis* *51*, 142–146.
- Tang, Y., Poustovoitov, M.V., Zhao, K., Garfinkel, M., Canutescu, A., Dunbrack, R., Adams, P.D., and Marmorstein, R. (2006). Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 921–929.
- Tang, Y., Puri, A., Ricketts, M.D., Rai, T.S., Hoffmann, J., Hoi, E., Adams, P.D., Schultz, D.C., and Marmorstein, R. (2012). Identification of an Ubinuclein 1 Region Required for Stability and Function of the Human HIRA/UBN1/CABIN1/ASF1a Histone H3.3 Chaperone Complex. *Biochemistry* *51*, 2366–2377.
- Taylor, K.R., Mackay, A., Truffaux, N., Butterfield, Y.S., Morozova, O., Philippe, C., Castel, D., Grasso, C.S., Vinci, M., Carvalho, D., et al. (2014). Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Genet.* *46*, 457–461.
- Tessarz, P., and Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 703–708.
- Thaler, von, A.-K., Kamenisch, Y., and Berneburg, M. (2010). The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis. *Exp. Dermatol.* *19*, 81–88.
- Tillhon, M., Cazzalini, O., Nardo, T., Necchi, D., Sommatitis, S., Stivala, L.A., Scovassi, A.I., and Prosperi, E. (2012). p300/CBP acetyl transferases interact with and acetylate the nucleotide excision repair factor XPG. *DNA Repair* *11*, 844–852.
- Tjeertes, J.V., Miller, K.M., and Jackson, S.P. (2009). Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *Embo J.* *28*, 1878–1889.
- Tornaletti, S., Reines, D., and Hanawalt, P.C. (1999). Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA. *J. Biol. Chem.* *274*, 24124–24130.
- Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* *402*, 555–560.
- Ura, K., Araki, M., Saeki, H., Masutani, C., Ito, T., Iwai, S., Mizukoshi, T., Kaneda, Y., and Hanaoka,

- F. (2001). ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes. *Embo J.* 20, 2004–2014.
- van Cuijk, L., Vermeulen, W., and Marteijn, J.A. (2014). Ubiquitin at work: the ubiquitous regulation of the damage recognition step of NER. *Exp. Cell Res.* 329, 101–109.
- van den Boom, V., Citterio, E., Hoogstraten, D., Zotter, A., Egly, J.-M., van Cappellen, W.A., Hoeijmakers, J.H.J., Houtsmuller, A.B., and Vermeulen, W. (2004). DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *J. Cell Biol.* 166, 27–36.
- van der Heijden, G.W., Derijck, A.A.H.A., Pósfai, E., Giele, M., Pelczar, P., Ramos, L., Wansink, D.G., Van der Vlag, J., Peters, A.H.F.M., and de Boer, P. (2007). Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat. Genet.* 39, 251–258.
- van der Heijden, G.W., Dieker, J.W., Derijck, A.A.H.A., Muller, S., Berden, J.H.M., Braat, D.D.M., Van der Vlag, J., and de Boer, P. (2005). Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech. Dev.* 122, 1008–1022.
- Venneti, S., Garimella, M.T., Sullivan, L.M., Martinez, D., Huse, J.T., Heguy, A., Santi, M., Thompson, C.B., and Judkins, A.R. (2013). Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol.* 23, 558–564.
- Vermeulen, W., and Fousteri, M. (2013). Mammalian transcription-coupled excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a012625.
- Vélez-Cruz, R., Zadorin, A.S., Coin, F., and Egly, J.-M. (2013). Sirt1 suppresses RNA synthesis after UV irradiation in combined xeroderma pigmentosum group D/Cockayne syndrome (XP-D/CS) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E212–E220.
- Voigt, P., LeRoy, G., Drury, W.J., Zee, B.M., Son, J., Beck, D.B., Young, N.L., Garcia, B.A., and Reinberg, D. (2012). Asymmetrically modified nucleosomes. *Cell* 151, 181–193.
- Volker, M., Moné, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Molecular Cell* 8, 213–224.
- Voon, H.P.J., Hughes, J.R., Rode, C., La Rosa-Velazquez, De, I.A., Jenuwein, T., Feil, R., Higgs, D.R., and Gibbons, R.J. (2015). ATRX Plays a Key Role in Maintaining Silencing at Interstitial Heterochromatic Loci and Imprinted Genes. *Cell Rep* 11, 405–418.
- Vrouwe, M.G., Pines, A., Overmeer, R.M., Hanada, K., and Mullenders, L.H.F. (2011). UV-induced photolesions elicit ATR-kinase-dependent signaling in non-cycling cells through nucleotide excision repair-dependent and -independent pathways. *Journal of Cell Science* 124, 435–446.
- Waddington, C.H. (1942). The epigenotype. *Endeavour* 18–20.
- Waddington, C.H. (1957). *The Strategy of the Genes: a Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology.* Allen and Unwin.
- Wakasugi, M., Kawashima, A., Morioka, H., Linn, S., Sancar, A., Mori, T., Nikaido, O., and Matsunaga, T. (2002). DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 277, 1637–1640.
- Walmacq, C., Cheung, A.C.M., Kireeva, M.L., Lubkowska, L., Ye, C., Gotte, D., Strathern, J.N.,

- Carell, T., Cramer, P., and Kashlev, M. (2012). Mechanism of translesion transcription by RNA polymerase II and its role in cellular resistance to DNA damage. *Molecular Cell* 46, 18–29.
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.-Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006a). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Molecular Cell* 22, 383–394.
- Wang, J., Chin, M.Y., and Li, G. (2006b). The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res.* 66, 1906–1911.
- Wang, Q.-E., Wani, M.A., Chen, J., Zhu, Q., Wani, G., El-Mahdy, M.A., and Wani, A.A. (2005). Cellular ubiquitination and proteasomal functions positively modulate mammalian nucleotide excision repair. *Mol. Carcinog.* 42, 53–64.
- Wang, Q.-E., Zhu, Q., Wani, G., Chen, J., and Wani, A.A. (2004). UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damaged-DNA binding protein, DDB2. *Carcinogenesis* 25, 1033–1043.
- Wang, Y., Chakravarty, P., Ranes, M., Kelly, G., Brooks, P.J., Neilan, E., Stewart, A., Schiavo, G., and Svejstrup, J.Q. (2014). Dysregulation of gene expression as a cause of Cockayne syndrome neurological disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 14454–14459.
- Wang, Z.G., Wu, X.H., and Friedberg, E.C. (1991). Nucleotide excision repair of DNA by human cell extracts is suppressed in reconstituted nucleosomes. *J. Biol. Chem.* 266, 22472–22478.
- Waterborg, J.H. (1991). Multiplicity of histone h3 variants in wheat, barley, rice, and maize. *Plant Physiol.* 96, 453–458.
- Waters, R., Evans, K., Bennett, M., Yu, S., and Reed, S. (2012). Nucleotide excision repair in cellular chromatin: studies with yeast from nucleotide to gene to genome. *Int J Mol Sci* 13, 11141–11164.
- WATSON, J.D., and CRICK, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738.
- Watson, L.A., Solomon, L.A., Li, J.R., Jiang, Y., Edwards, M., Shin-ya, K., Beier, F., and Bérubé, N.G. (2013). Atrx deficiency induces telomere dysfunction, endocrine defects, and reduced life span. *J. Clin. Invest.* 123, 2049–2063.
- Weber, C.M., and Henikoff, S. (2014). Histone variants: dynamic punctuation in transcription. *Genes Dev.* 28, 672–682.
- Wen, D., Banaszynski, L.A., Liu, Y., Geng, F., Noh, K.-M., Xiang, J., Elemento, O., Rosenwaks, Z., Allis, C.D., and Rafii, S. (2014a). Histone variant H3.3 is an essential maternal factor for oocyte reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7325–7330.
- Wen, D., Banaszynski, L.A., Rosenwaks, Z., Allis, C.D., and Rafii, S. (2014b). H3.3 replacement facilitates epigenetic reprogramming of donor nuclei in somatic cell nuclear transfer embryos. *Nucleus* 5, 369–375.
- Wen, H., Li, Y., Xi, Y., Jiang, S., Stratton, S., Peng, D., Tanaka, K., Ren, Y., Xia, Z., Wu, J., et al. (2014c). ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression. *Nature* 508, 263–268.
- Wilson, M.D., Harreman, M., and Svejstrup, J.Q. (2013). Ubiquitylation and degradation of elongating RNA polymerase II: the last resort. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 151–157.

- Wirbelauer, C., Bell, O., and Schübeler, D. (2005). Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias. *Genes Dev.* *19*, 1761–1766.
- Wollmann, H., Holec, S., Alden, K., Clarke, N.D., Jacques, P.-É., and Berger, F. (2012). Dynamic deposition of histone variant H3.3 accompanies developmental remodeling of the Arabidopsis transcriptome. *PLoS Genet.* *8*, e1002658.
- Wong, L.H., Ren, H., Williams, E., McGhie, J., Ahn, S., Sim, M., Tam, A., Earle, E., Anderson, M.A., Mann, J., et al. (2009). Histone H3.3 incorporation provides a unique and functionally essential telomeric chromatin in embryonic stem cells. *Genome Res.* *19*, 404–414.
- Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Becksfort, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., et al. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat. Genet.* *44*, 251–253.
- Wu, G., Diaz, A.K., Paugh, B.S., Rankin, S.L., Ju, B., Li, Y., Zhu, X., Qu, C., Chen, X., Zhang, J., et al. (2014). The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat. Genet.* *46*, 444–450.
- Wu, M.H., Chang, J.H., and Yung, B.Y.M. (2002). Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis* *23*, 93–100.
- Wu, R.S., and Bonner, W.M. (1981). Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* *27*, 321–330.
- Wu, R.S., Tsai, S., and Bonner, W.M. (1982). Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell* *31*, 367–374.
- Xu, H., Kim, U.J., Schuster, T., and Grunstein, M. (1992). Identification of a new set of cell cycle-regulatory genes that regulate S-phase transcription of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *12*, 5249–5259.
- Xue, Y., Gibbons, R., Yan, Z., Yang, D., McDowell, T.L., Sechi, S., Qin, J., Zhou, S., Higgs, D., and Wang, W. (2003). The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10635–10640.
- Yamane, K., Mizuguchi, T., Cui, B., Zofall, M., Noma, K.-I., and Grewal, S.I.S. (2011). Asf1/HIRA facilitate global histone deacetylation and associate with HP1 to promote nucleosome occupancy at heterochromatic loci. *Molecular Cell* *41*, 56–66.
- Yang, J.-H., Choi, J.-H., Jang, H., Park, J.-Y., Han, J.-W., Youn, H.-D., and Cho, E.-J. (2011a). Histone chaperones cooperate to mediate Mef2-targeted transcriptional regulation during skeletal myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *407*, 541–547.
- Yang, J.-H., Song, Y., Seol, J.-H., Park, J.-Y., Yang, Y.-J., Han, J.-W., Youn, H.-D., and Cho, E.-J. (2011b). Myogenic transcriptional activation of MyoD mediated by replication-independent histone deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 85–90.
- Yang, X., Li, L., Liang, J., Shi, L., Yang, J., Yi, X., Zhang, D., Han, X., Yu, N., and Shang, Y. (2013). Histone acetyltransferase 1 promotes homologous recombination in DNA repair by facilitating histone turnover. *J. Biol. Chem.* *288*, 18271–18282.
- Yasui, A., Eker, A.P., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M., and Oikawa, A. (1994). A

- new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *Embo J.* *13*, 6143–6151.
- Yeh, J.I., Levine, A.S., Du, S., Chinte, U., Ghodke, H., Wang, H., Shi, H., Hsieh, C.L., Conway, J.F., Van Houten, B., et al. (2012). Damaged DNA induced UV-damaged DNA-binding protein (UV-DDB) dimerization and its roles in chromatinized DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, E2737–E2746.
- Yuen, B.T.K., and Knoepfler, P.S. (2013). Histone H3.3 mutations: a variant path to cancer. *Cancer Cell* *24*, 567–574.
- Yuen, B.T.K., Bush, K.M., Barrilleaux, B.L., Cotterman, R., and Knoepfler, P.S. (2014). Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Development* *141*, 3483–3494.
- Yukawa, M., Akiyama, T., Franke, V., Mise, N., Isagawa, T., Suzuki, Y., Suzuki, M.G., Vlahovicek, K., Abe, K., Aburatani, H., et al. (2014). Genome-wide analysis of the chromatin composition of histone H2A and H3 variants in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE* *9*, e92689.
- Zhang, L., Nemzow, L., Chen, H., Hu, J.J., and Gong, F. (2014). Whole genome expression profiling shows that BRG1 transcriptionally regulates UV inducible genes and other novel targets in human cells. *PLoS ONE* *9*, e105764.
- Zhang, L., Zhang, Q., Jones, K., Patel, M., and Gong, F. (2009). The chromatin remodeling factor BRG1 stimulates nucleotide excision repair by facilitating recruitment of XPC to sites of DNA damage. *Cell Cycle* *8*, 3953–3959.
- Zhang, X., Horibata, K., Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, S.-I., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M., Nohmi, T., et al. (2012). Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat. Genet.* *44*, 593–597.
- Zhao, Q., Wang, Q.-E., Ray, A., Wani, G., Han, C., Milum, K., and Wani, A.A. (2009). Modulation of nucleotide excision repair by mammalian SWI/SNF chromatin-remodeling complex. *J. Biol. Chem.* *284*, 30424–30432.
- Zhu, Q., Wani, G., Arab, H.H., El-Mahdy, M.A., Ray, A., and Wani, A.A. (2009). Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damaged genomic sites. *DNA Repair* *8*, 262–273.
- Ziani, S., Nagy, Z., Alekseev, S., Soutoglou, E., Egly, J.-M., and Coin, F. (2014). Sequential and ordered assembly of a large DNA repair complex on undamaged chromatin. *J. Cell Biol.* *206*, 589–598.
- Ziv, O., Zeisel, A., Mirlas-Neisberg, N., Swain, U., Nevo, R., Ben-Chetrit, N., Martelli, M.P., Rossi, R., Schiesser, S., Canman, C.E., et al. (2014). Identification of novel DNA-damage tolerance genes reveals regulation of translesion DNA synthesis by nucleophosmin. *Nat Commun* *5*, 5437.

ANNEXES

Annexe 1 : Dynamique de la chromatine, dommages de l'ADN et régulation de la transcription

Blurring the line between the DNA damage response and transcription : the importance of chromatin dynamics.

Effacer les limites entre les voies de réponse aux dommages de l'ADN et la transcription : l'importance de la dynamique de la chromatine.

Salomé Adam, Sophie E. Polo

Exp. Cell. Res., 329 : 148-153, 2014

Dans cette revue, nous présentons nos connaissances actuelles de l'impact de différents types de dommages de l'ADN (dimères de pyrimidines, cassures de l'ADN, oxydations de bases) sur la régulation de la production d'ARN après stress génotoxique dans des cellules de mammifères. Nous décrivons également des données récentes révélant que la chromatine est une plateforme complexe d'intégration du signal, coordonnant réparation des dommages et régulation de la transcription :

- (1) Des protéines impliquées dans la dynamique de la chromatine, notamment des enzymes de modifications post-traductionnelles et des chaperons d'histones, sont des facteurs clés de la régulation de l'activité transcriptionnelle après stress génotoxique.
- (2) La compaction et l'état transcriptionnel de la chromatine influencent la réparation des lésions de l'ADN.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexcr

Review Article

Blurring the line between the DNA damage response and transcription: The importance of chromatin dynamics

Salomé Adam^{a,b}, Sophie E. Polo^{a,*}^aEpigenetics and Cell Fate Centre, UMR7216 CNRS, Paris Diderot University, 75205 Paris cedex 13, France^bNuclear Dynamics unit, UMR3664 CNRS, Institut Curie, 75248 Paris cedex 5, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 1 July 2014

Accepted 14 July 2014

Available online 22 July 2014

Keywords:

DNA damage

Transcription regulation

Transcription coupled repair

Histone dynamics

Chromatin modifications

Genome integrity

ABSTRACT

DNA damage interferes with the progression of transcription machineries. A tight coordination of transcription with signaling and repair of DNA damage is thus critical for safeguarding genome function. This coordination involves modulations of chromatin organization. Here, we focus on the central role of chromatin dynamics, in conjunction with DNA Damage Response (DDR) factors, in controlling transcription inhibition and restart at sites of DNA damage in mammalian cells. Recent work has identified chromatin modifiers and histone chaperones as key regulators of transcriptional activity in damaged chromatin regions. Conversely, the transcriptional state of chromatin before DNA damage influences both DNA damage signaling and repair. We discuss the importance of chromatin plasticity in coordinating the interplay between the DDR and transcription, with major implications for cell fate maintenance.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

Introduction	149
Role of DDR factors in transcriptional regulation of damaged genes	149
Importance of chromatin dynamics in the transcriptional regulation of damaged genes	149
Chromatin modifications	149
Histone mobilization	150
Impact of chromatin transcriptional state on damage signaling and repair	151
Conclusions	151
Acknowledgments	151
References	152

*Corresponding author.

E-mail address: sophie.polo@univ-paris-diderot.fr (S.E. Polo).<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.017>

0014-4827/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Our genome is constantly assaulted by genotoxic agents, which not only compromise the integrity of DNA and its packaging into chromatin [1] but also perturb cell transcriptional programs by interfering with the progression and function of transcription machineries [2,3]. If left unrepaired, DNA damage can lead to the production of aberrant transcripts or to prolonged transcription inhibition, with adverse cellular outcomes including cell death and disease. A tight control of transcription, in close coordination with signaling and repair of DNA damage, is thus critical for safeguarding cellular functions.

In this review, we focus on the central role of chromatin dynamics, in conjunction with DNA Damage Response (DDR) factors, in regulating transcription at sites of DNA damage in mammalian cells.

Role of DDR factors in transcriptional regulation of damaged genes

In addition to regulating the expression of stress-responsive genes, DNA lesions result in transcriptional inhibition in damaged chromatin regions, which is critical to avoid interference between transcription and repair machineries [2]. DNA damage-induced transcriptional arrest is rapid and transient, as initially revealed by analyzing the incorporation of radiolabeled uridine analogs into nascent transcripts in UltraViolet (UV)-irradiated human fibroblasts [4]. Such control of transcriptional activity is localized to sites of DNA lesions, as shown by irradiating cells through micropore filters [5], and recovery of RNA synthesis after UV damage is dependent on proficient UV damage repair [4,5]. This response is not restricted to UV damage as RNA synthesis is also excluded from γ H2A.X foci forming upon exposure of cells to ionizing radiation (IR), a DNA Double-Strand Break (DSB) inducing agent, suggesting that transcription is also suppressed at DSB sites [6]. Profiling RNA polymerase II (RNAPII) occupancy and nascent transcript production in the vicinity of the breaks showed that transcription is inhibited at damaged genes or at genes immediately adjacent to DSBs induced by site specific endonucleases [7–9]. In addition to impacting RNAPII transcription, DNA damage also inhibits the synthesis of ribosomal RNA by RNAPI in mammalian cells [10,11] but the underlying mechanisms deserve further investigation.

Identifying the molecular players regulating transcription in damaged chromatin has been the focus of intense research, providing evidence for the existence of repair factors dedicated to the repair of DNA lesions in transcribed genes. Cells have indeed developed specific pathways for rapid removal of DNA lesions on the transcribed DNA strand, called Transcription Coupled Repair (TCR), primarily characterized in the context of Nucleotide Excision Repair of UV damage (reviewed in [2,12,13]), and recently described after DSB induction in yeast [14]. UV damage and more generally bulky adducts are RNAPII blocking lesions, leading to the accumulation of stalled RNAPII molecules at sites of DNA damage and thus transcription inhibition. TCR factors, Cockayne Syndrome (CS) proteins and UV-stimulated scaffold protein A (UVSSA) in particular, are required both for efficient repair of these lesions and for transcription recovery, which involves displacement of stalled RNAPII and/or its targeting

to ubiquitin-dependent proteasome degradation (reviewed in [2,13]). In addition to repair factors, recent studies have implicated transcription factors in regulating transcription recovery after UV damage. For instance, Eleven-nineteen Lysine-rich Leukemia (ELL) has been proposed to serve as a docking platform for factors that would stimulate RNAPII restart [15], and transcription factor IIS (TFIIS) would facilitate the backtracking of RNAPII stalled at DNA lesions [16]. Unlike the response to UV damage, which directly blocks RNAPII progression, transcription arrest at sites of DSBs is controlled by DNA damage sensor proteins. Indeed, the signaling kinase Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) and the DSB repair factor DNA-dependent Protein Kinase (DNA-PK) were identified as key players of break-mediated inhibition of transcription in response to FokI and I-Ppol induced breaks, respectively [8,9]. It was also suggested that Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) facilitates transcriptional silencing at DSBs [17]. It is conceivable that the localization of the breaks, their nature and their number may influence which DSB sensor is required for transcriptional arrest. Furthermore, it is still to be determined whether turning off the enzymatic pathways and reversing the modifications involved in transcription arrest is sufficient for transcription restart in response to DNA breaks or if additional mechanisms are at play.

Importantly, DDR factors identified as regulators of transcriptional arrest or recovery at damaged sites act on a chromatinized template, where DNA is wrapped around histone proteins to form nucleosomes. It is thus crucial to integrate chromatin dynamics in the control of damaged gene expression.

Importance of chromatin dynamics in the transcriptional regulation of damaged genes

Transcription and DNA damage repair both involve a transient disorganization of chromatin, underlying the importance of chromatin plasticity in regulating these processes.

Chromatin modifications

Chromatin modifications—affecting both the DNA and histone proteins—have been involved in the transcriptional regulation of damaged genes. Indeed, ubiquitylation of H2A histones, a modification implicated in transcription repression, was found enriched at DSBs and associated with the ATM-dependent transcription silencing in response to FokI-induced breaks [8] (Fig. 1). However, ubiquitylated H2A was not involved in response to I-Ppol-mediated cuts [9], again suggesting that how and where DSBs are induced in the genome may influence the underlying mechanism of transcriptional arrest. DSBs and oxidative damage, when introduced in CpG island-rich promoters, also trigger the accumulation of chromatin modifiers, including DNA methyltransferases (DNMT 1 and 3a), Polycomb group proteins (PcG) along with histone deacetylases (SIRT1, Sirtuin 1) [18,19] (Fig. 1). The targeting of these well-characterized mediators of transcription repression correlates with the enrichment of histone marks associated with transcription silencing (hypoacetylation, H3K9 and K27 trimethylation). Similarly, trimethylated H3K27 was observed at DNA damage foci induced by ion micro-irradiation, with a concomitant exclusion of H3K4 trimethylation, a histone modification typical of actively transcribed chromatin [20]. SIRT1 deacetylase activity has also been involved in suppressing RNA synthesis in response to UV damage in repair deficient cells [21], but whether

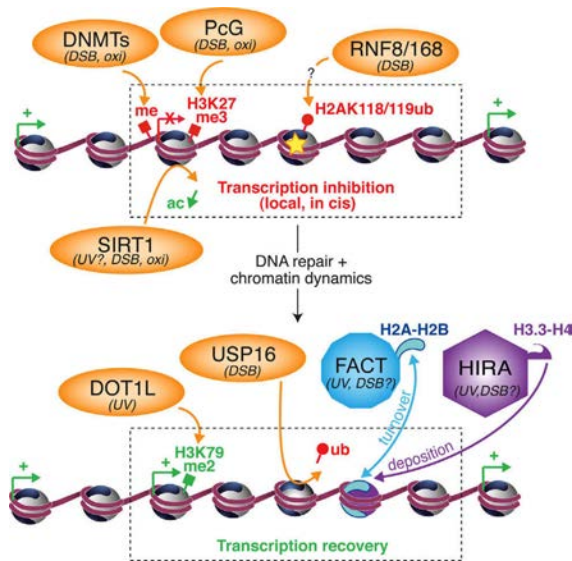


Fig. 1 – Importance of chromatin dynamics in the transcriptional regulation of damaged genes. Chromatin modifiers (orange) and histone chaperones (blue, purple) involved in regulating transcription inhibition (top) and recovery (bottom) in damaged chromatin regions in response to DSBs, UV lesions, oxidative damage (DNA damage is represented by a star). DNA damage-responsive chromatin modifications associated with active transcription (green) and silencing (red) are represented. ac: acetylation; me: methylation; ub: ubiquitylation. Given that RNF8/168 ubiquitin ligases are not known to target K118/119 residues on H2A, an intermediate factor is likely involved as indicated by a question mark.

it operates similarly in repair proficient cells deserves further investigation. In addition to these repressive chromatin modifiers, several heterochromatin components and marks, generally associated with transcription repression, are found enriched at damaged sites [1,22,23], but it is not yet clear if they actually contribute to the transcriptional silencing of damaged chromatin.

DNA damage-induced histone modifications also impact on the reactivation of gene expression after repair of DNA lesions. Indeed, Ubiquitin Specific Peptidase 16 (USP16) relieves ATM-mediated transcription silencing at DSB sites, most likely via its capacity to deubiquitylate H2A [8] (Fig. 1). H3K79me₂, a histone mark enriched in actively transcribed regions, accumulates transiently at gene promoters upon UVC irradiation, and its down-regulation by knockout of the methyltransferase Disruptor of Telomeric silencing-1 homolog (DOT1L) prevents transcription recovery after UV damage in mouse fibroblasts [24]. Treating cells with the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A, which results in chromatin decompaction, rescues the DOT1L phenotype, suggesting that DOT1L-dependent methylation of H3K79 may favor an open chromatin structure around the UV-repressed gene promoters, which facilitates transcription re-initiation after repair (Fig. 1). In light of these data, it would be of major interest to perform in depth analysis of the dynamic changes of activating and repressive histone marks after DNA damage in order to

identify additional chromatin modifying factors involved in transcription regulation after genotoxic stress.

Histone mobilization

Not only does genotoxic stress alter histone modification profiles at gene promoters, but it also leads to the mobilization of histone proteins [25]. Chromatin remodeling complexes are key players in histone dynamics and they participate in signaling and repair of DNA lesions [26]. However, their contribution to DNA damage-induced transcription regulation is far from being completely understood. It has been proposed that PARP-dependent remodelers could mediate transcription silencing at DNA breaks [17], but there is still no direct evidence in the literature supporting such model. The remodeling activity of the repair factor CSB is important for UV resistance and not for recruiting downstream TCR factors to chromatin, it is thus tempting to speculate that this activity plays a role in transcription recovery [27]. Besides chromatin remodeling factors, histone chaperones can mobilize histones in and out of chromatin. Recent studies have unveiled the importance of two histone chaperone complexes in transcription restart following UV damage in human cells, the H3.3-specific chaperone Histone Regulator A (HIRA) and the H2A-H2B chaperone Facilitates Chromatin Transcription (FACT) (reviewed in [28]) (Fig. 1). HIRA is targeted to UV-damaged chromatin regions where it deposits newly synthesized H3.3 histones in a manner coupled to DNA damage detection and it facilitates transcription recovery after repair [29]. Because H3.3 histones generally bear modifications associated with active transcription and tend to make nucleosomes more labile [30], these incorporated H3.3 histones have been proposed to constitute a chromatin bookmark that renders damaged chromatin prone for transcription restart upon completion of DNA repair by maintaining a plastic and transcription-permissive chromatin structure at sites of DNA lesions. In line with this hypothesis, it has been recently demonstrated that transcription induction in mouse embryonic stem cells is primed by H3.3 histone deposition, via an opening of chromatin at enhancers and promoters [31]. Given that HIRA and H3.3 also accumulate at DSB sites [29,32], it is tempting to speculate that HIRA-mediated deposition of H3.3 promotes transcription resumption at DSBs by a similar mechanism. In addition to its contribution to transcription recovery, it will be interesting to investigate whether the function of HIRA in stimulating transcriptional activation of stress-responsive genes described in yeast [33] is conserved in mammalian cells. Noteworthy, point mutations have been recently identified in H3.3 in several human cancers, some of them affecting H3 modification profiles [34,35]. In light of these findings, it will be important to assess the functional consequences of such mutations on transcription restart after UV damage, which could contribute to their oncogenic potential.

Similar to HIRA, the histone chaperone FACT was shown to promote transcription recovery after UV damage repair [36]. FACT is recruited to UV-damaged chromatin independently of DNA repair and accelerates H2A-H2B turnover in UV-damaged regions [36]. Such increased histone turnover may destabilize nucleosomes, facilitating backtracking of stalled RNAPII away from the DNA lesion, and ultimately transcription resumption. Stimulating histone exchange at sites of DNA damage may also be a way to dilute repressive histone marks associated with transcription silencing in damaged regions, thus favoring the restoration of a

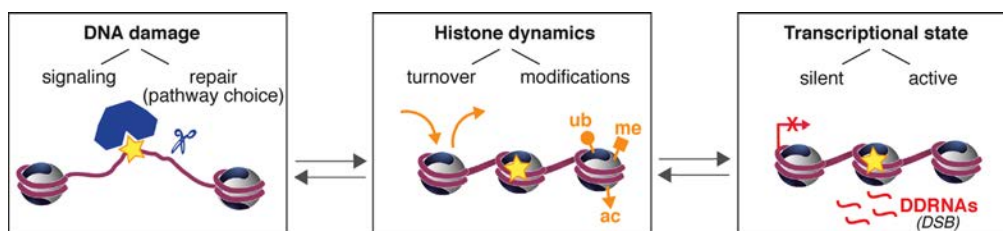


Fig. 2 – Histone dynamics at the core of the interplay between the DDR and transcription. DNA damage-induced histone dynamics, including histone exchange and post-translational modifications, govern local changes in chromatin transcriptional activity. Conversely, chromatin transcriptional state, via histone modifications, modulates DNA damage signaling and repair.

transcriptionally competent chromatin landscape. FACT also accumulates at IR-induced foci [37], suggesting a potential role for FACT in controlling transcription restart after DSB repair as well. Notably, FACT is also important for protecting cells against transcription-induced DNA damage by promoting the resolution of R-loops resulting from transcription-replication conflicts [38]. A detailed analysis of the underlying mechanism should bring new insights into how FACT controls the crosstalk between the DDR and transcription. Moreover, both HIRA and FACT could also indirectly regulate transcription recovery after UV damage, by promoting TCR of UV lesions, which deserves to be closely examined in future studies.

Altogether, significant advances have been made in identifying chromatin modifiers and histone chaperones as key regulators of transcriptional activity in damaged chromatin regions, highlighting the importance of chromatin dynamics in coordinating the interplay between the DDR and transcription.

Impact of chromatin transcriptional state on damage signaling and repair

Conversely, the transcriptional state of chromatin before DNA damage influences both DNA damage signaling and repair. For instance, heterochromatin, which is mostly transcriptionally silent, is known to be refractory to late steps of the DSB response, which are restricted to the periphery of heterochromatin domains (reviewed in [1]). Nevertheless, depletion of heterochromatin components that are targeted to sites of DNA breaks, such as heterochromatin protein 1 (HP1), impairs DSB signaling and repair, suggesting an active contribution of heterochromatin proteins to the DSB response.

In addition to regulating DNA damage signaling and repair, the pre-existing transcriptional state of chromatin may be instrumental for fine-tuning the repair process as recently demonstrated in the context of DSB repair. DSBs are processed by two major pathways, homologous recombination, which uses a homologous sequence for repairing the damaged DNA, and non-homologous end-joining, which repairs DSBs by direct ligation of the two broken ends. A higher frequency of incorrect end use during end-joining of tandem DSBs was observed in an active transcription context in human cells [39]. Furthermore, DSBs located in actively transcribed chromatin regions, marked by the transcription elongation-associated histone modification H3K36me3, are preferentially repaired by homologous recombination because they facilitate the recruitment of factors involved in DNA-end resection [40,41]. However, studies in yeast

reported an opposite function for H3K36me3 in promoting the end-joining process [42,43], suggesting that the role of H3K36me3 in determining DSB repair pathway choice is not strictly conserved during evolution.

Finally, recent data revealed that, unexpectedly, transcriptional activity is not completely inhibited in damaged chromatin as small non-coding RNA species are produced at DSB sites with a major role in controlling initial DDR steps [44–46]. This pathway is evolutionarily conserved but it has only been reported in the response to DNA breaks so far and future studies should examine whether it also occurs in response to other types of DNA lesions. Furthermore, it is still unclear how these DNA Damage Response RNAs (DDRNA) control DNA damage signaling and repair. It would be of major interest to investigate whether they cooperate with factors regulating chromatin plasticity to induce chromatin changes at sites of DNA breaks, which would stimulate the recruitment of DDR factors.

Conclusions

Recent work has shed light on the key regulatory role of chromatin dynamics, together with DDR factors, for stopping and re-establishing transcriptional programs after DNA damage. Chromatin can thus be viewed as an integration platform that coordinates DNA damage signaling and repair with transcription (Fig. 2). It will be important to further dissect the molecular bases of this interplay between the DDR, chromatin and transcription and to understand how DDR factors work in concert with chromatin changes to orchestrate DNA repair and transcription control. This will help us to fully appreciate the consequences of disease-associated alterations in the chromatin landscape on genome integrity and function.

Acknowledgments

We thank Evi Soutoglou for critical reading of the manuscript. We apologize to colleagues whose work could not be cited due to space constraints. Research in the laboratory is supported by the European Research Council (ERC-2013-StG-336427 “EpIn”), the French National Research Agency (ANR-12-JSV6-0002-01), the “Who am I?” laboratory of excellence, EDF Radiobiology program (RB 2014-01) and the Fondation ARC (SFI20121205449). S.A. is recipient of a PhD fellowship from University Pierre & Marie Curie.

REFERENCES

- [1] G. Soria, S.E. Polo, G. Almouzni, Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response, *Mol. Cell.* 46 (2012) 722–734.
- [2] J.Q. Svejstrup, The interface between transcription and mechanisms maintaining genome integrity, *Trends Biochem. Sci.* 35 (2010) 333–338.
- [3] Y.W. Fong, C. Cattoglio, R. Tjian, The intertwined roles of transcription and repair proteins, *Mol. Cell.* 52 (2013) 291–302.
- [4] L.V. Mayne, A.R. Lehmann, Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum, *Cancer Res.* 42 (1982) 1473–1478.
- [5] M.J. Moné, M. Volker, O. Nikaido, L.H. Mullenders, A.A. van Zeeland, P.J. Verschure, et al., Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition, *EMBO Rep.* 2 (2001) 1013–1017.
- [6] L.V. Solovjeva, M.P. Svetlova, V.O. Chagin, N.V. Tomilin, Inhibition of transcription at radiation-induced nuclear foci of phosphorylated histone H2AX in mammalian cells, *Chromosome Res.* 15 (2007) 787–797.
- [7] J.S. Iacovoni, P. Caron, I. Lassadi, E. Nicolas, L. Massip, D. Trouche, et al., High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome, *Embo J.* 29 (2010) 1446–1457.
- [8] N.M. Shanbhag, I.U. Rafalska-Metcalf, C. Balane-Bolivar, S.M. Janicki, R.A. Greenberg, ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks, *Cell* 141 (2010) 970–981.
- [9] T. Pankotai, C. Bonhomme, D. Chen, E. Soutoglou, DNAPKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19 (2012) 276–282.
- [10] M. Kruhlak, E.E. Crouch, M. Orlov, C. Montañó, S.A. Gorski, A. Nussenzweig, et al., The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks, *Nature* 447 (2007) 730–734.
- [11] A.S. Calkins, J.D. Iglehart, J.-B. Lazaro, DNA damage-induced inhibition of rRNA synthesis by DNA-PK and PARP-1, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 7378–7386.
- [12] P.C. Hanawalt, G. Spivak, Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 958–970.
- [13] W. Vermeulen, M. Fousteri, Mammalian transcription-coupled excision repair, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a012625.
- [14] P. Chaurasia, R. Sen, T.K. Pandita, S.R. Bhaumik, Preferential repair of DNA double-strand break at the active gene in vivo, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 36414–36422.
- [15] S. Mourgues, V. Gautier, A. Lagarou, C. Bordier, A. Mourcet, J. Slingerland, et al., ELL, a novel TFIIH partner, is involved in transcription restart after DNA repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 17927–17932.
- [16] A. Jensen, L.H.F. Mullenders, Transcription factor IIS impacts UV-inhibited transcription, *DNA Repair* 9 (2010) 1142–1150.
- [17] D.M. Chou, B. Adamson, N.E. Dephoure, X. Tan, A.C. Nottke, K.E. Hurov, et al., A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 18475–18480.
- [18] H.M. O'hagan, H.P. Mohammad, S.B. Baylin, Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island, *PLoS Genet.* 4 (2008) e1000155.
- [19] H.M. O'hagan, W. Wang, S. Sen, C. Destefano Shields, S.S. Lee, Y.W. Zhang, et al., Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands, *Cancer Cell* 20 (2011) 606–619.
- [20] D.M. Seiler, J. Rouquette, V.J. Schmid, H. Strickfaden, C. Ottmann, G.A. Drexler, et al., Double-strand break-induced transcriptional silencing is associated with loss of tri-methylation at H3K4, *Chromosome Res.* 19 (2011) 883–899.
- [21] R. Vélez-Cruz, A.S. Zadorin, F. Coin, J.-M. Egly, Sirt1 suppresses RNA synthesis after UV irradiation in combined xeroderma pigmentosum group D/Cockayne syndrome (XP-D/CS) cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) E212–20.
- [22] J.H.A. Vissers, M. van Lohuizen, E. Citterio, The emerging role of polycomb repressors in the response to DNA damage, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 3939–3948.
- [23] M.K. Ayrapetov, O. Gursoy-Yuzugullu, C. Xu, Y. Xu, B.D. Price, DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 9169–9174.
- [24] V. Oksenyich, A. Zhovmer, S. Ziani, P.-O. Mari, J. Eberova, T. Nardo, et al., Histone methyltransferase DOT1L drives recovery of gene expression after a genotoxic attack, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003611.
- [25] S.E. Polo, Reshaping chromatin after DNA damage: the choreography of histone proteins, *J. Mol. Biol.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.05.025> (Epub ahead of print).
- [26] H. Lans, J.A. Marteijn, W. Vermeulen, ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response, *Epigenetics Chromatin* 5 (2012) 4.
- [27] I. Cho, P.-F. Tsai, R.J. Lake, A. Basheer, H.-Y. Fan, ATP-dependent chromatin remodeling by cockayne syndrome protein B and NAP1-like histone chaperones is required for efficient transcription-coupled DNA repair, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003407.
- [28] I. Mandemaker, W. Vermeulen, J. Marteijn, Role of chromatin remodeling during the transcriptional restart upon DNA damage, *Nucleus* 5 (2014) (Epub ahead of print).
- [29] S. Adam, S.E. Polo, G. Almouzni, Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA, *Cell* 155 (2013) 94–106.
- [30] E. Szenker, D. Ray-Gallet, G. Almouzni, The double face of the histone variant H3.3, *Cell Res.* 21 (2011) 421–434.
- [31] P. Chen, J. Zhao, Y. Wang, M. Wang, H. Long, D. Liang, et al., H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin, *Genes Dev.* 27 (2013) 2109–2124.
- [32] X. Yang, L. Li, J. Liang, L. Shi, J. Yang, X. Yi, et al., Histone acetyltransferase 1 promotes homologous recombination in DNA repair by facilitating histone turnover, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 18271–18282.
- [33] M. Chujo, Y. Tarumoto, K. Miyatake, E. Nishida, F. Ishikawa, HIRA, a conserved histone chaperone plays an essential role in low-dose stress response via transcriptional stimulation in fission yeast, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 23440–23450.
- [34] B.T.K. Yuen, P.S. Knoepfler, Histone H3.3 mutations: a variant path to cancer, *Cancer Cell.* 24 (2013) 567–574.
- [35] S. Behjati, P.S. Tarpey, N. Presneau, S. Scheipl, N. Pillay, P. Van Loo, et al., Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone, *Nat. Genet.* 45 (2013) 1479–1482.
- [36] C. Dinant, G. Ampatzidis-Michailidis, H. Lans, M. Tresini, A. Lagarou, M. Grosbart, et al., Enhanced chromatin dynamics by FACT promotes transcriptional restart after UV-induced DNA damage, *Mol. Cell.* 51 (2013) 469–479.
- [37] D.V. Oliveira, A. Kato, K. Nakamura, T. Ikura, M. Okada, J. Kobayashi, et al., Histone chaperone FACT regulates homologous recombination by chromatin remodeling through interaction with RNF20, *J. Cell Sci.* 127 (2014) 763–772.
- [38] E. Herrera-Moyano, X. Mergui, M.L. Garcia-Rubio, S. Barroso, A. Aguilera, The yeast and human FACT chromatin-reorganizing

- complexes solve R-loop-mediated transcription-replication conflicts, *Genes Dev.* 28 (2014) 735–748.
- [39] A. Gunn, N. Bennardo, A. Cheng, J.M. Stark, Correct end use during end joining of multiple chromosomal double strand breaks is influenced by repair protein RAD50, DNA-dependent protein kinase DNA-PKcs, and transcription context, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 42470–42482.
- [40] F. Aymard, B. Bugler, C.K. Schmidt, E. Guillou, P. Caron, S. Briois, et al., Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 21, 366–374.
- [41] S.X. Pfister, S. Ahrabi, L.-P. Zalmas, S. Sarkar, F. Aymard, C.Z. Bachrati, T. Helleday, G. Legube, N.B. La Thangue, A.C.G. Porter, et al., SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability, *Cell Rep.* 7 (2014) (2014) 2006–2018.
- [42] C.-C. Pai, R.S. Deegan, L. Subramanian, C. Gal, S. Sarkar, E.J. Blaikley, et al., A histone H3K36 chromatin switch coordinates DNA double-strand break repair pathway choice, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4091.
- [43] D.K. Jha, B.D. Strahl, An RNA polymerase II-coupled function for histone H3K36 methylation in checkpoint activation and DSB repair, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3965.
- [44] S. Francia, F. Michelini, A. Saxena, D. Tang, M. de Hoon, V. Anelli, et al., Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response, *Nature* 488 (2012) 231–235.
- [45] W. Wei, Z. Ba, M. Gao, Y. Wu, Y. Ma, S. Amiard, et al., A role for small RNAs in DNA double-strand break repair, *Cell* 149 (2012) 101–112.
- [46] K.M. Michalik, R. Böttcher, K. Förstemann, A small RNA response at DNA ends in *drosophila*, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 9596–9603.

Annexe 2 : Chaperons d'histones H3 et restitution de l'organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine

How to restore chromatin structure and function in response to DNA damage : let the chaperone play.

Comment est restituée l'organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN : laissez jouer les chaperons d'histones.

Salomé Adam, Sophie E. Polo, Geneviève Almouzni

FEBS J., 281 : 2315-2323, 2014

Dans cette revue, nous discutons des progrès récents relatifs à la dynamique des variants de l'histone H3 et de leurs chaperons dédiés après irradiation locale aux UVC dans les cellules de mammifères. Nous mettons plus particulièrement l'accent sur l'identification de deux voies de restitution de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN :

- (1) La mise en place précoce de nouvelles histones H3.3 par le chaperon HIRA, ce facteur étant requis pour rendre la chromatine apte à reprendre son activité transcriptionnelle associée à la réparation des lésions UVC.
- (2) L'incorporation tardive de nouvelles histones H3.1 par le chaperon CAF-1, permettant de réorganiser la structure de la chromatine lésée.

How to restore chromatin structure and function in response to DNA damage – let the chaperones play

Salomé Adam^{1,2,3,4,5,6}, Sophie E. Polo⁶ and Geneviève Almouzni^{1,2,3,4,5}

1 Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France

2 Centre National de la Recherche Scientifique, UMR3664, Paris, France

3 Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Paris, France

4 Institut de Formation Doctorale, University Pierre & Marie Curie, Paris, France

5 Sorbonne University, PSL*, Paris, France

6 Epigenetics and Cell Fate Centre, UMR7216, Centre National de la Recherche Scientifique/Paris Diderot University, Paris, France

Keywords

CAF-1; chromatin assembly; DNA damage; DNA repair; H3.1; H3.3; HIRA; histone chaperones; histone variants; UV irradiation

Correspondence

G. Almouzni, Institut Curie Research Centre, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 5, France

Fax: +33 1 46 33 30 16

Tel: +33 1 56 24 67 01

E-mail: genevieve.almouzni@curie.fr

(Received 10 February 2014, accepted 25 March 2014)

doi:10.1111/febs.12793

Histone deposition onto DNA assisted by specific chaperones forms the chromatin basic unit and serves to package the genome within the cell nucleus. The resulting chromatin organization, often referred to as the epigenome, contributes to a unique transcriptional program that defines cell identity. Importantly, during cellular life, substantial alterations in chromatin structure may arise due to cell stress, including DNA damage, which not only challenges the integrity of the genome but also threatens the epigenome. Considerable efforts have been made to decipher chromatin dynamics in response to genotoxic stress, and to assess how it affects both genome and epigenome stability. Here, we review recent advances in understanding the mechanisms of DNA damage-induced chromatin plasticity in mammalian cells. We focus specifically on the dynamics of histone H3 variants in response to UV irradiation, and highlight the role of their dedicated chaperones in restoring both chromatin structure and function. Finally, we discuss how, in addition to restoring chromatin integrity, the cellular networks that signal and repair DNA damage may also provide a window of opportunity for modulating the information conveyed by chromatin.

Introduction

In the nucleus of eukaryotic cells, the information that determines gene expression and cellular functions is encoded not only in the DNA sequence but also by regulating its packaging into chromatin, a repetitive nucleoprotein structure whose basic unit is the nucleosome [1]. Its core particle comprises DNA wrapped around an octamer of histone proteins [a (H3–H4)₂ tetramer flanked by two H2A–H2B dimers] (Fig. 1) [2]. Higher levels of chromatin compaction are achieved by association of the chromatin fiber with inter-nucleosomal histones such as H1, as well as

non-histone proteins and structural RNA molecules [3,4]. In addition to changes in its compaction status, the chromatin structure presents variations in its elementary components (Fig. 1), forming the so-called epigenome that is typical of a given cell type and whose inheritance through cell generations is being actively studied. DNA and histone molecules are subject to chemical modifications controlling gene expression [5], and histone proteins exist as variant forms that differ in their amino acid sequence and carry specific post-translational modifications [6]. Histone

Abbreviations

CAF-1, chromatin assembly factor 1; HIRA, histone regulator A.

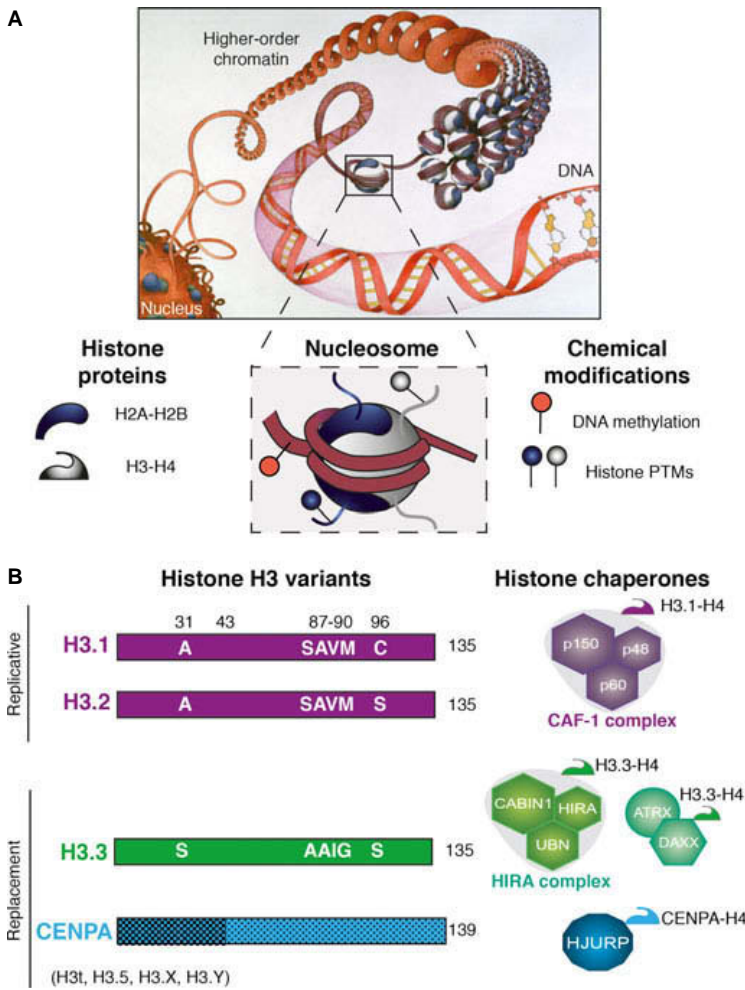


Fig. 1. Chromatin organization, histone H3 variants and their dedicated chaperones in mammalian cells. (A) Illustration of the chromatin structure (created by N. Bouvier for G. Almouzni), showing its building block (the nucleosome) and modifications of its elementary components, i.e. DNA and histone proteins. PTMs, post-translational modifications. (B) Representation of the main histone H3 variants and their specific chaperones in mammalian cells. Amino acids that differ between variants are indicated, except for the more divergent variant centromeric protein A, where the density of the hatching corresponds to the level of divergence in the protein sequence. ATRX, α -thalassemia/mental retardation syndrome, X-linked; CABIN1, calcineurin-binding protein 1; CAF-1, chromatin assembly factor 1; CENPA, centromeric protein A; DAXX, death domain-associated protein; HIRA, histone regulator A; HJURP, Holliday junction recognition protein; UBN1, ubinuclein 1.

variants show distinct expression profiles during the cell cycle and according to cellular differentiation. Their expression profile influences their timing of incorporation into chromatin. Furthermore, different variants show distinct distributions within chromatin. Histone H3 variants represent an excellent example to illustrate this concept [7] (Fig. 1). In addition to the replicative variants H3.1 and H3.2, which make up the major proportion of total H3 in cycling cells, cells also express replacement variants including H3.3 and centromeric protein A (CENPA). Replicative H3 variants are expressed mainly during S phase, and are deposited at sites of DNA synthesis, and replacement variants are found in well-defined chromatin regions: CENPA is specific to centromeres, while H3.3 is enriched at actively expressed genes and in silent heterochromatin regions.

Deposition of histone variants in chromatin relies on their association with dedicated histone chaperones [8,9], as revealed by analyzing the composition of soluble histone complexes [10–15]: the chaperone complex chromatin assembly factor 1 (CAF-1) associates with replicative H3 variants and promotes H3.1 deposition onto newly synthesized DNA, the histone regulator A (HIRA) complex is critical for H3.3 accumulation into active chromatin, and death domain-associated protein (DAXX) and the protein α -thalassemia/mental retardation syndrome, X-linked (ATRAX) are involved in localization of H3.3 into silent heterochromatin regions. Finally, the chaperone Holliday junction recognition protein (HJURP) is key to deposition of CENPA at centromeres (Fig. 1). These patterns of histone variants provide a typical landscape reflecting genome functions and cell identity. However,

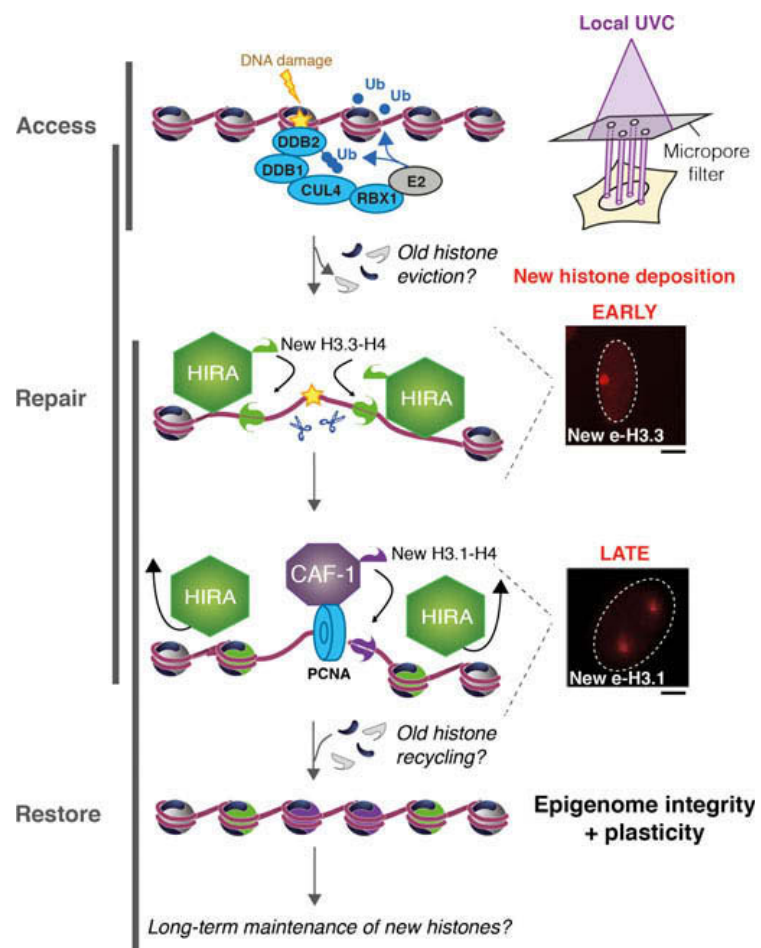
this well-orchestrated chromatin organization is challenged by DNA replication, transcription and repair, and a long-standing issue in the field of chromatin research is to understand to what extent the integrity of the epigenome must be maintained, while still offering the plasticity necessary for all DNA metabolic activities.

Chromatin dynamics in response to DNA damage

Among DNA metabolic activities, DNA damage repair is particularly challenging for epigenome stability. Indeed, multiple sources of genotoxic stress may trigger DNA damage in any chromatin region at any time, threatening the integrity of the DNA molecule [16]. Additionally, repair of DNA damage has major consequences for chromatin organization. Early work

analyzing chromatin accessibility to nuclease digestion in human cells exposed to UV irradiation [17,18] shed light on the rearrangements of chromatin structure that occur in response to DNA damage, leading to the so-called 'access-repair-restore' model. In this model, damaged chromatin is initially destabilized to facilitate access of repair machineries, and subsequently reorganized upon completion of DNA repair [19–22] (Fig. 2). Such rearrangements of chromatin may extend up to several kilobases from UV lesions [23], even though the size of the oligonucleotide excised during UV damage repair *in vivo* is only approximately 30 nucleotides [24]. Chromatin rearrangements in response to DNA damage probably involve nucleosome dynamics (i.e. sliding, disassembly and re-assembly) promoted by key regulators of chromatin structure. Among them, chromatin remodeling factors [25,26] are thought to remove, slide or exchange nucleosomes in the vicinity of DNA

Fig. 2. Contribution of histone H3 variant dynamics to reorganization of the chromatin structure in response to UVC damage. Left: the 'access-repair-restore' model illustrating the chromatin rearrangements that occur in response to UVC irradiation in human cells. HIRA-mediated deposition of new H3.3 histones precedes CAF-1-dependent incorporation of new H3.1 histones. Parental histones displaced from damaged regions may be recycled. The long-term fate of newly deposited histones after damage has yet to be determined. Proteins shown in blue are the key repair factors that facilitate recruitment of the histone chaperones HIRA and CAF-1 to UV-damaged chromatin regions. Adapted from [53] with permission (Cell Press, Elsevier). CAF-1, chromatin assembly factor 1; CUL4A, Cullin 4A; DDB1 and DDB2, DNA damage binding proteins 1 and 2; HIRA, histone regulator A; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RBX1, RING-box protein 1; Ub, ubiquitin. Right: fluorescence microscopy images reproduced from [52,53] with permission (Cell Press, Elsevier), showing the accumulation of epitope-tagged versions of newly synthesized H3 variants (e-H3) in human cells at sites of local UVC irradiation. The dashed line indicates the cell nucleus. Scale bars = 10 μ m.



damage sites, while histone-modifying enzymes [5] act to modulate the DNA damage response, and histone chaperone proteins [8,9] mobilize specific histone variants in and out of damaged chromatin. Nucleosome dynamics after DNA damage have been reported primarily in the context of the UV damage response [27,28] and following DNA double-strand breaks [29–31].

Here, we review recent advances in understanding histone dynamics in response to genotoxic stress, focusing on the central role of histone H3 variants. We examine how these variants, together with their dedicated chaperones, participate in restoring both chromatin structure and function in response to UV irradiation in mammalian cells.

CAF-1 and the restoration of chromatin structure coupled to repair synthesis

CAF-1 was the first histone H3 chaperone whose contribution to chromatin dynamics in response to UV irradiation [32] was extensively studied in mammalian cells. This evolutionarily conserved histone chaperone complex, comprising subunits p150, p60 and p48 in human cells [7,8] (Fig. 1), was initially identified on the basis of its ability to stimulate nucleosome assembly during DNA replication in *in vitro* supercoiling assays [33,34]. Purification of soluble histone complexes from HeLa cells stably expressing epitope-tagged versions of H3 histones then revealed that CAF-1 specifically associates with the replicative variant H3.1 and promotes H3.1 deposition onto replicating DNA *in vitro* [11]. Recently, specific tracking of newly synthesized histones *in vivo*, by exploiting the powerful SNAP tag-based technology [35], showed that CAF-1-mediated deposition of new H3.1 histones is restricted to S-phase cells and co-localizes with replication foci [36]. How the incorporation of H3.1 into chromatin is regulated is currently under investigation, and there is growing evidence that histone post-translational modifications play a critical role in this process. Indeed, although H3 and H4 N-terminal tails are dispensable for CAF-1-mediated nucleosome assembly *in vitro* [37], acetylation of N-terminal lysine residues on H4 in dimers with H3.1 favors histone nuclear import and interaction with CAF-1 in human cells, thus promoting H3.1 incorporation into chromatin [38]. Furthermore, acetylation and ubiquitylation of lysine residues on histone H3 in yeast cells facilitate replication-coupled deposition of H3 [39–41].

Not only does CAF-1 stimulate chromatin reorganization during DNA replication, but it also promotes chromatin assembly in response to genotoxic stress, as

first described in *in vitro* supercoiling experiments using UV-damaged plasmids [32], and later confirmed by analyzing histone deposition on immobilized UV-damaged DNA [11,27,42–44]. Further investigation of the underlying mechanism revealed that CAF-1 acts in synergy with another histone H3 chaperone named anti-silencing factor 1 (ASF1), which associates with the CAF-1 p60 subunit [45,46], and that CAF-1 promotes nucleosome assembly coupled to DNA repair synthesis *in vitro* via direct interaction between its p150 subunit and the DNA polymerase sliding clamp proliferating cell nuclear antigen (PCNA) [47] (Fig. 2).

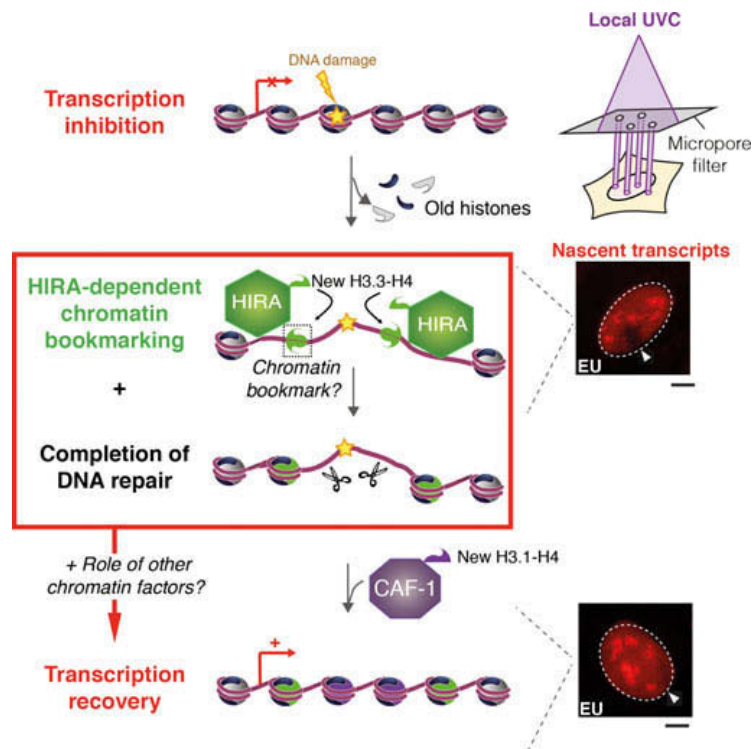
In vivo, CAF-1 is recruited to damaged chromatin in UVC-irradiated HeLa cells [45,48]. This recruitment was shown to be a local event, as irradiating cells with a UVC lamp through micropore filters [49,50] (Fig. 2) induced local enrichment of both CAF-1 p60 and p150 subunits at UV damage sites [51]. Importantly, this enrichment depends on the late steps of nucleotide excision repair [51–53], the main DNA repair pathway that removes UVC lesions [54], suggesting a possible contribution of the H3.1-specific chaperone CAF-1 to restoring chromatin structure after DNA damage *in vivo*. Transient expression of FLAG-HA-tagged H3.1 combined with local UVC irradiation in HeLa cells resulted in clear accumulation of newly synthesized H3.1 variants at damage sites in a CAF-1-dependent manner [52]. Furthermore, this histone deposition event requires repair synthesis. Thus CAF-1 is critical for chromatin restoration after repair of UVC damage (Figs 2 and 3). Importantly, new histone species are incorporated by CAF-1 into repaired chromatin, indicating that the epigenome is challenged even after repair of DNA damage.

In conclusion, the histone chaperone CAF-1 represents the first known H3-depositing complex with a role in chromatin dynamics in response to genotoxic stress in mammals. This chaperone is key to restoring the integrity of chromatin structure by mediating *de novo* incorporation of H3.1 histones after UV damage repair (Fig. 2). CAF-1 may play a similar role in response to other types of DNA lesions, as local accumulation of CAF-1 in damaged chromatin regions also occurs at sites of DNA breaks in both human and mouse cells [52,55,56].

HIRA and chromatin bookmarking for transcription restart after repair

Subsequent to these studies, the role of other histone H3 chaperones in the dynamics of damaged chromatin has been investigated, revealing an unexpected contribution of the HIRA-mediated H3.3 deposition pathway.

Fig. 3. Contribution of histone H3 variant dynamics to restoring chromatin transcriptional activity in response to UVC damage. Left: model depicting the parallel regulation of chromatin transcriptional activity and chromatin structure (at the level of histone H3 variants) after UVC irradiation in human cells. Early bookmarking of chromatin by the H3.3 chaperone HIRA and completion of DNA repair are both required for transcription restart. Adapted from [53] with permission (Cell Press, Elsevier). Right: ethynyl uridine (EU) labeling of nascent transcripts 1 h (transcription inhibition) and 20 h (transcription recovery) after local UVC damage in human cell nuclei (delineated by the dashed lines). Images are reproduced from [53] with permission (Cell Press, Elsevier). Arrowheads indicate sites of irradiation. Scale bars = 10 μm .



Similar to CAF-1, the histone chaperone HIRA is a complex comprising three main subunits: HIRA, ubinuclein 1 (UBN1) and calcineurin-binding protein 1 (CABIN1) [57] (Fig. 1), but, unlike CAF-1, HIRA specifically associates with the H3.3 variant [11,36]. Supercoiling assays and H3.3 deposition experiments on immobilized DNA further established that HIRA promotes nucleosome assembly independently of DNA synthesis *in vitro* [11,58]. In line with these *in vitro* assays, *in vivo* tracking of newly synthesized histones combined with siRNA-mediated depletion of HIRA complex subunits demonstrated that HIRA deposits new H3.3 histones throughout interphase in cycling human cells [36]. Like the CAF-1 pathway, HIRA-mediated H3.3 deposition *in vivo* is promoted by histone post-translational modifications, including phosphorylation and acetylation on H4 [59,60], and it also potentially regulated by the histone chaperone ASF1, which directly interacts with HIRA [11,46].

In contrast to CAF-1-mediated H3.1 incorporation, early *in vitro* work failed to show any involvement of the HIRA-dependent H3.3 deposition pathway in response to genotoxic stress. Indeed, HIRA-depleted *Xenopus* egg extracts retained their capacity to assem-

ble nucleosomes onto UV-damaged plasmids [58], and there was no evidence for H3.3 deposition onto immobilized UV-damaged DNA [11]. However, these assays only reveal reactions that may be recapitulated in an *in vitro* system on naked DNA. However, analysis of the response to UVC damage *in vivo* on chromatinized material demonstrated an enrichment of the H3.3 chaperone HIRA at damaged sites in human cells that precedes CAF-1 accumulation [53]. Furthermore, new H3.3 variants are incorporated locally into UVC-damaged chromatin in a HIRA-dependent manner (Fig. 2). A role for the other H3.3-specific chaperone DAXX was not detected in this response. Further analysis demonstrated that early ubiquitylation events mediated by the DNA damage detection complex comprising DNA damage binding proteins 1 and 2 and Cullin 4A are required for early and transient targeting of HIRA to UV lesions [53] (Fig. 2). Intriguingly, HIRA depletion in human cells not only affected new H3.3 deposition but also *de novo* incorporation of H3.1 in damaged chromatin. These data reveal a more general role for the HIRA chaperone in controlling H3 variant deposition pathways in response to DNA damage *in vivo* that deserves to be closely examined in future studies.

Remarkably, HIRA-dependent histone deposition not only contributes to maintaining the integrity of chromatin organization in response to DNA damage, but also plays an important role in restoring chromatin transcriptional activity, without affecting UV damage repair [53] (Fig. 3). Transcription regulation is a critical feature of the DNA damage response: its local inhibition at sites of DNA lesions avoids both production of aberrant transcripts and collisions between repair and transcription machineries [61]. Transcription restart after repair of DNA damage ensures full recovery of cellular function [62–64]. Nascent transcript labeling in UV-irradiated human cells (Fig. 3) lacking candidate histone chaperones revealed that HIRA, but not CAF-1, promotes transcription recovery after UVC damage [53]. HIRA recruitment to damaged chromatin is independent of transcription, raising the intriguing question of the consequences of HIRA-mediated histone deposition in chromatin regions that were originally silent, such as heterochromatin domains. Furthermore, HIRA promotes transcriptional reactivation in a surprising manner, as transcription resumes hours after HIRA release from damaged chromatin. This led to the hypothesis of HIRA-mediated chromatin bookmarking early in the damage response, which renders damaged chromatin prone to transcription reactivation upon completion of DNA repair (Fig. 3) [53]. Given the importance of HIRA-dependent H3.3 deposition for maintaining gene expression patterns *in vivo*, as shown in several vertebrate systems [65–67], it is tempting to propose that newly deposited H3.3 constitutes the chromatin bookmark left by HIRA on damaged chromatin that facilitates transcription reactivation (Fig. 3). In addition to HIRA, other key players in histone dynamics have been involved in transcription recovery post UVC irradiation [68,69], namely the histone chaperone facilitates chromatin transcription (FACT) and the H3K79 methyl transferase disruptor of telomeric silencing 1 homolog (DOT1L). The mechanism of action of these factors remains to be elucidated: the FACT chaperone enhances the dynamics of H2A/H2B histones at damage sites but how this facilitates transcription restart is still unknown [68]. DOT1L may prevent the heterochromatinization of the damaged chromatin that would make it refractory to transcription initiation [69]. Future studies are required to investigate how these chromatin factors, whether in synergy with HIRA or not, contribute to transcription reactivation upon UV damage.

Altogether, current evidence supports a model in which HIRA-dependent H3.3 histone incorporation coupled to DNA damage recognition serves as an early chromatin licensing system that allows damaged

chromatin to resume transcription upon completion of DNA repair (Figs 2 and 3). The human histone chaperone HIRA thus represents a critical factor for restoring both chromatin structure and function in response to genotoxic stress. As HIRA is also recruited locally to sites of DNA breaks [53,70], where it promotes H3.3 accumulation [60], a major issue is to address whether HIRA also facilitates transcriptional reactivation in this context.

Conclusions

Over the past few decades, great advances have been made in our understanding of chromatin plasticity in response to DNA damage in mammalian cells. Our increased knowledge of the dynamics of histone variants in damaged chromatin and the role of their dedicated chaperones is a clear illustration of these advances. However, we are only beginning to understand how nucleosomes are reassembled after DNA damage repair. At least two *de novo* histone deposition pathways – HIRA-dependent H3.3 incorporation followed by CAF-1-mediated H3.1 deposition – cooperate to restore chromatin organization and function in response to genotoxic stress *in vivo* (Figs 2 and 3). H2A/H2B also show enhanced dynamics in UV-damaged chromatin regions, but how this coordinates with deposition of the inner core histones H3 and H4 has not been addressed. Furthermore, although we have determined how newly synthesized histones are incorporated at damage sites, we know very little concerning the fate of parental histones (Fig. 2). Their potential replacement by newly synthesized histones with distinct post-translational modification patterns [71] is likely to alter chromatin-based information, raising the issue of the extent to which epigenome integrity is preserved. Determining the relative contributions of parental histone recycling versus new histone incorporation into damaged chromatin would allow us to understand not only how the parental chromatin information is maintained, but also to determine to what extent the DNA damage response represents a window of opportunity for modulating chromatin information and ultimately cellular functions.

Acknowledgements

This review is based on a lecture given at the FEBS/EMBO Women in Science award ceremony at the FEBS Meeting 2013 in St Petersburg, in which G. Almouzni wished to underline the importance of mentoring women such as S. Adam and S. Polo. G. Almouzni thanks FEBS and EMBO for this

award, and is grateful to all past and present members of her research group, among which many talented women worked actively with men to contribute to the work described in this talk. G.A.'s laboratory is supported by funding from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue), Programmes Incitatifs et Collaboratifs, the European Commission, the Agence Nationale de la Recherche and Aviesan-Institut Thématique MultiOrganismes Cancer. S.A. is the recipient of a PhD fellowship from the University Pierre & Marie Curie. Research in S.P.'s laboratory is supported by the Agence Nationale de la Recherche and the Fondation Association pour la Recherche sur le Cancer.

Author contribution

Salomé Adam, Sophie E. Polo and Geneviève Almouzni wrote the manuscript.

References

- Kornberg RD (1977) Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* **46**, 931–954.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF & Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260.
- Probst AV, Dunleavy E & Almouzni G (2009) Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 192–206.
- Li G & Reinberg D (2011) Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 175–186.
- Bannister AJ & Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**, 381–395.
- Talbert PB & Henikoff S (2010) Histone variants – ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 264–275.
- Szenker E, Ray-Gallet D & Almouzni G (2011) The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res* **21**, 421–434.
- De Koning L, Corpet A, Haber JE & Almouzni G (2007) Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 997–1007.
- Burgess RJ & Zhang Z (2013) Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 14–22.
- Latreille D, Bluy L, Benkirane M & Kiernan RE (2014) Identification of histone 3 variant 2 interacting factors. *Nucleic Acids Res*, doi: 10.1093/nar/gkt1355.
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G & Nakatani Y (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51–61.
- Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, Lacoste N, Ray-Gallet D, Nakamura Y, Daigo Y, Nakatani Y & Almouzni-Pettinotti G (2009) HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* **137**, 485–497.
- Foltz DR, Jansen LET, Bailey AO, Yates JR, Bassett EA, Wood S, Black BE & Cleveland DW (2009) Centromere-specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* **137**, 472–484.
- Drané P, Ouararhni K, Depaux A, Shuaib M & Hamiche A (2010) The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev* **24**, 1253–1265.
- Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh K-M, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, Dewell S, Law M, Guo X, Li X *et al.* (2010) Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* **140**, 678–691.
- Ciccio A & Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**, 179–204.
- Smerdon MJ & Lieberman MW (1978) Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA-repair synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 4238–4241.
- Smerdon MJ & Lieberman MW (1980) Distribution within chromatin of deoxyribonucleic acid repair synthesis occurring at different times after ultraviolet radiation. *Biochemistry* **19**, 2992–3000.
- Smerdon MJ (1991) DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 422–428.
- Green CM & Almouzni G (2002) When repair meets chromatin. *EMBO Rep* **3**, 28–33.
- Groth A, Rocha W, Verreault A & Almouzni G (2007) Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* **128**, 721–733.
- Soria G, Polo SE & Almouzni G (2012) Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol Cell* **46**, 722–734.
- Mathis GA & Althaus FR (1990) Isolation of 8-methoxypsoralen accessible DNA domains from chromatin of intact cells. *Cell Biol Toxicol* **6**, 35–45.
- Hu J, Choi J-H, Gaddameedhi S, Kemp MG, Reardon JT & Sancar A (2013) Nucleotide excision repair in human cells: fate of the excised oligonucleotide carrying DNA damage *in vivo*. *J Biol Chem* **288**, 20918–20926.
- Hargreaves DC & Crabtree GR (2011) ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* **21**, 396–420.
- Flaus A & Owen-Hughes T (2011) Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: the means to the end. *FEBS J* **278**, 3579–3595.

- 27 Adam S & Polo SE (2012) Chromatin dynamics during nucleotide excision repair: histones on the move. *Int J Mol Sci* **13**, 11895–11911.
- 28 Palomera-Sanchez Z & Zurita M (2011) Open, repair and close again: chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. *DNA Repair* **10**, 119–125.
- 29 Peterson CL & Almouzni G (2013) Nucleosome dynamics as modular systems that integrate DNA damage and repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012658.
- 30 Price BD & D'Andrea AD (2013) Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* **152**, 1344–1354.
- 31 Smeenk G & van Attikum H (2013) The chromatin response to DNA breaks: leaving a mark on genome integrity. *Annu Rev Biochem* **82**, 55–80.
- 32 Gaillard PH, Martini EM, Kaufman PD, Stillman B, Moustacchi E & Almouzni G (1996) Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* **86**, 887–896.
- 33 Stillman B (1986) Chromatin assembly during SV40 DNA replication *in vitro*. *Cell* **45**, 555–565.
- 34 Smith S & Stillman B (1989) Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication *in vitro*. *Cell* **58**, 15–25.
- 35 Bodor D, Rodríguez M & Moreno N (2012) Analysis of protein turnover by quantitative SNAP-based pulse-chase imaging. *Curr Protoc Cell Biol* **55**, 8.8.1–8.8.34.
- 36 Ray-Gallet D, Woolfe A, Vassias I, Pellentz C, Lacoste N, Puri A, Schultz DC, Pchelintsev NA, Adams PD, Jansen LET *et al.* (2011) Dynamics of histone H3 deposition *in vivo* reveal a nucleosome gap-filling mechanism for H3.3 to maintain chromatin integrity. *Mol Cell* **44**, 928–941.
- 37 Shibahara K, Verreault A & Stillman B (2000) The N-terminal domains of histones H3 and H4 are not necessary for chromatin assembly factor-1-mediated nucleosome assembly onto replicated DNA *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 7766–7771.
- 38 Zhang H, Han J, Kang B, Burgess R & Zhang Z (2012) Human histone acetyltransferase 1 protein preferentially acetylates H4 histone molecules in H3.1–H4 over H3.3–H4. *J Biol Chem* **287**, 6573–6581.
- 39 Li Q, Zhou H, Wurtele H, Davies B, Horazdovsky B, Verreault A & Zhang Z (2008) Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly. *Cell* **134**, 244–255.
- 40 Han J, Zhang H, Zhang H, Wang Z, Zhou H & Zhang Z (2013) A Cul4 E3 ubiquitin ligase regulates histone hand-off during nucleosome assembly. *Cell* **155**, 817–829.
- 41 Burgess RJ, Zhou H, Han J & Zhang Z (2010) A role for Gcn5 in replication-coupled nucleosome assembly. *Mol Cell* **37**, 469–480.
- 42 Moggs JG & Almouzni G (1999) Assays for chromatin remodeling during DNA repair. *Methods Enzymol* **304**, 333–351.
- 43 Mello JA, Moggs JG & Almouzni G (2006) Analysis of DNA repair and chromatin assembly *in vitro* using immobilized damaged DNA substrates. *Methods Mol Biol* **314**, 477–487.
- 44 Gérard A, Polo SE, Roche D & Almouzni G (2006) Methods for studying chromatin assembly coupled to DNA repair. *Methods Enzymol* **409**, 358–374.
- 45 Mello JA, Silljé HHW, Roche DMJ, Kirschner DB, Nigg EA & Almouzni G (2002) Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep* **3**, 329–334.
- 46 Tang Y, Poustovoitov MV, Zhao K, Garfinkel M, Canutescu A, Dunbrack R, Adams PD & Marmorstein R (2006) Structure of a human ASF1a–HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 921–929.
- 47 Moggs JG, Grandi P, Quivy JP, Jónsson ZO, Hübscher U, Becker PB & Almouzni G (2000) A CAF-1–PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol Cell Biol* **20**, 1206–1218.
- 48 Martini E, Roche DM, Marheineke K, Verreault A & Almouzni G (1998) Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *J Cell Biol* **143**, 563–575.
- 49 Moné MJ, Volker M, Nikaido O, Mullenders LH, van Zeeland AA, Verschure PJ, Manders EM & van Driel R (2001) Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Rep* **2**, 1013–1017.
- 50 Katsumi S, Kobayashi N, Imoto K, Nakagawa A, Yamashina Y, Muramatsu T, Shirai T, Miyagawa S, Sugiura S, Hanaoka F *et al.* (2001) *In situ* visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts. *J Invest Dermatol* **117**, 1156–1161.
- 51 Green CM & Almouzni G (2003) Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair *in vivo*. *EMBO J* **22**, 5163–5174.
- 52 Polo SE, Roche D & Almouzni G (2006) New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* **127**, 481–493.
- 53 Adam S, Polo SE & Almouzni G (2013) Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA. *Cell* **155**, 94–106.
- 54 Nospikel T (2009) DNA repair in mammalian cells: nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* **66**, 994–1009.
- 55 Okano S, Lan L, Caldecott KW, Mori T & Yasui A (2003) Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol* **23**, 3974–3981.

- 56 Baldeyron C, Soria G, Roche D, Cook AJL & Almouzni G (2011) HP1 α recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair. *J Cell Biol* **193**, 81–95.
- 57 Amin AD, Vishnoi N & Prochasson P (2013) A global requirement for the HIR complex in the assembly of chromatin. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 264–276.
- 58 Ray-Gallet D, Quivy J-P, Scamps C, Martini EM-D, Lipinski M & Almouzni G (2002) HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell* **9**, 1091–1100.
- 59 Kang B, Pu M, Hu G, Wen W, Dong Z, Zhao K, Stillman B & Zhang Z (2011) Phosphorylation of H4 Ser47 promotes HIRA-mediated nucleosome assembly. *Genes Dev* **25**, 1359–1364.
- 60 Yang X, Li L, Liang J, Shi L, Yang J, Yi X, Zhang Di, Han X, Yu N & Shang Y (2013) Histone acetyltransferase 1 promotes homologous recombination in DNA repair by facilitating histone turnover. *J Biol Chem* **288**, 18271–18282.
- 61 Svejstrup JQ (2010) The interface between transcription and mechanisms maintaining genome integrity. *Trends Biochem Sci* **35**, 333–338.
- 62 Hanawalt PC & Spivak G (2008) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 958–970.
- 63 Tornaletti S (2009) DNA repair in mammalian cells: transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1010–1020.
- 64 Gaillard H & Aguilera A (2013) Transcription coupled repair at the interface between transcription elongation and mRNP biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 141–150.
- 65 Jullien J, Astrand C, Szenker E, Garrett N, Almouzni G & Gurdon J (2012) HIRA dependent H3.3 deposition is required for transcriptional reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocytes. *Epigenetics Chromatin* **5**, 17.
- 66 Szenker E, Lacoste N & Almouzni G (2012) A developmental requirement for HIRA-dependent H3.3 deposition revealed at gastrulation in *Xenopus*. *Cell Rep* **1**, 730–740.
- 67 Yang J-H, Song Y, Seol J-H, Park JY, Yang Y-J, Han J-W, Youn H-D & Cho E-J (2011) Myogenic transcriptional activation of MyoD mediated by replication-independent histone deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 85–90.
- 68 Dinant C, Ampatzidis-Michailidis G, Lans H, Tresini M, Lagarou A, Grosbart M, Theil AF, van Cappellen WA, Kimura H, Bartek J *et al.* (2013) Enhanced chromatin dynamics by FACT promotes transcriptional restart after UV-induced DNA damage. *Mol Cell* **51**, 469–479.
- 69 Oksenysh V, Zhovmer A, Ziani S, Mari P-O, Eberova J, Nardo T, Stefanini M, Giglia-Mari G, Egly J-M & Coin F (2013) Histone methyltransferase DOT1L drives recovery of gene expression after a genotoxic attack. *PLoS Genet* **9**, e1003611.
- 70 Adamson B, Smogorzewska A, Sigoillot FD, King RW & Elledge SJ (2012) A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nat Cell Biol* **14**, 318–328.
- 71 Loyola A, Bonaldi T, Roche D, Imhof A & Almouzni G (2006) PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol Cell* **24**, 309–316.

Annexe 3 : Dynamique de la chromatine associée à la réparation des dommages par excision de nucléotides

Chromatin dynamics during nucleotide excision repair : Histones on the move.

La dynamique de la chromatine associée à la réparation de l'ADN par excision de nucléotides : les histones en mouvement.

Salomé Adam, Sophie E. Polo

Int. J. Mol. Sci., 13 : 11895-11911, 2012

Dans cette revue, nous exposons nos connaissances relatives à la dynamique de la chromatine couplée à la réparation par excision de nucléotides (NER), selon le modèle « Accessibilité-Réparation-Restitution ». Historiquement, ce modèle a décrit les réarrangements de la chromatine associés au NER, avant d'être étendu à d'autres voies de réparation de l'ADN. Cette revue est organisée en deux temps :

- (1) Présentation des méthodes *in vivo* et *in vitro* permettant d'analyser la désorganisation puis la réorganisation de la chromatine associée au NER.
- (2) Présentation des mécanismes contrôlant la dynamique de la chromatine NER-induite, en insistant sur le rôle joué par les enzymes de modifications post-traductionnelles des histones, les facteurs de remodelage de la chromatine et les chaperons d'histones.

Int. J. Mol. Sci. **2012**, *13*, 11895-11911; doi:10.3390/ijms130911895

OPEN ACCESS

International Journal of
Molecular Sciences

ISSN 1422-0067

www.mdpi.com/journal/ijms

Review

Chromatin Dynamics during Nucleotide Excision Repair: Histones on the Move

Salomé Adam ^{1,2} and Sophie E. Polo ^{1,2,*}

¹ Laboratory of Chromatin Dynamics, Curie Institute Research Centre, 75248 Paris Cedex 5, France;
E-Mail: salome.adam@curie.fr

² Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 218,
75248 Paris Cedex 5, France

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: sophie.polo@curie.fr;
Tel.: +33-1-5624-6721; Fax: +33-1-4633-3016.

Received: 21 August 2012; in revised form: 6 September 2012 / Accepted: 7 September 2012 /
Published: 19 September 2012

Abstract: It has been a long-standing question how DNA damage repair proceeds in a nuclear environment where DNA is packaged into chromatin. Several decades of analysis combining *in vitro* and *in vivo* studies in various model organisms ranging from yeast to human have markedly increased our understanding of the mechanisms underlying chromatin disorganization upon damage detection and re-assembly after repair. Here, we review the methods that have been developed over the years to delineate chromatin alterations in response to DNA damage by focusing on the well-characterized Nucleotide Excision Repair (NER) pathway. We also highlight how these methods have provided key mechanistic insight into histone dynamics coupled to repair in mammals, raising new issues about the maintenance of chromatin integrity. In particular, we discuss how NER factors and central players in chromatin dynamics such as histone modifiers, nucleosome remodeling factors, and histone chaperones function to mobilize histones during repair.

Keywords: chromatin; histone chaperone; histone dynamics; nucleosome remodeling factor; Nucleotide Excision Repair; ubiquitylation; UV

1. Introduction

In the cell nucleus, DNA is packaged into chromatin, a complex nucleoprotein structure whose basic unit is the nucleosome [1]. The nucleosome core particle is composed of approximately 146 base pairs of DNA wrapped around an octamer of histone proteins comprising a (H3–H4)₂ tetramer flanked by two H2A–H2B dimers [2]. Linker histones such as H1 and non-histone proteins also associate with the nucleosomal fiber, contributing to the formation of higher-order chromatin structures and nuclear domains [3,4]. Beyond this basic organization, the chromatin fiber shows variations in its compaction level and in its elementary components due to the existence of histone variants and post-translational modifications (reviewed in [5–8]). Altogether, these parameters provide an additional layer of information, potentially inherited through multiple cell generations, which controls gene expression and ultimately dictates cell function [3].

One of the key issues in the chromatin field is to understand how the information conveyed by chromatin is preserved while allowing all DNA metabolic activities (*i.e.*, DNA replication, transcription, and repair) that necessarily disorganize—at least transiently—chromatin structure. Several factors, including nucleosome remodeling factors, histone modifying enzymes, and histone chaperones, have emerged as critical players in chromatin dynamics (reviewed in [7,9–12]). Chromatin plasticity is particularly important during DNA repair as DNA damage occurs in an unscheduled manner and involves rearrangements of chromatin structure that prime chromatin for repair and help restore its integrity. These rearrangements, described in the Access/Prime-Repair-Restore model [13–16], involve the disorganization and subsequent re-organization of chromatin, the mechanisms of which are still incompletely understood.

Here, we review the methods that have been used to study histone dynamics during DNA repair and we present key findings from studies in mammalian cells that have contributed to build this model (extensive work conducted in other eukaryotic systems such as yeast is reviewed by others in this issue). More specifically, we focus on Nucleotide Excision Repair (NER), an evolutionarily conserved pathway that removes helix-distorting lesions such as those induced by UVC (UltraViolet C) light. This pathway has been extensively studied and its molecular players are well characterized (reviewed in [17]). Thus, it represents an attractive model that can be manipulated to address the issue of chromatin dynamics after DNA damage. In this review, we first describe the dynamic changes in chromatin structure that have been observed during NER. Then, we present our current knowledge of the mechanisms underlying these dynamics, with an emphasis on the role of specific histone modifications, nucleosome remodelers, and histone chaperones.

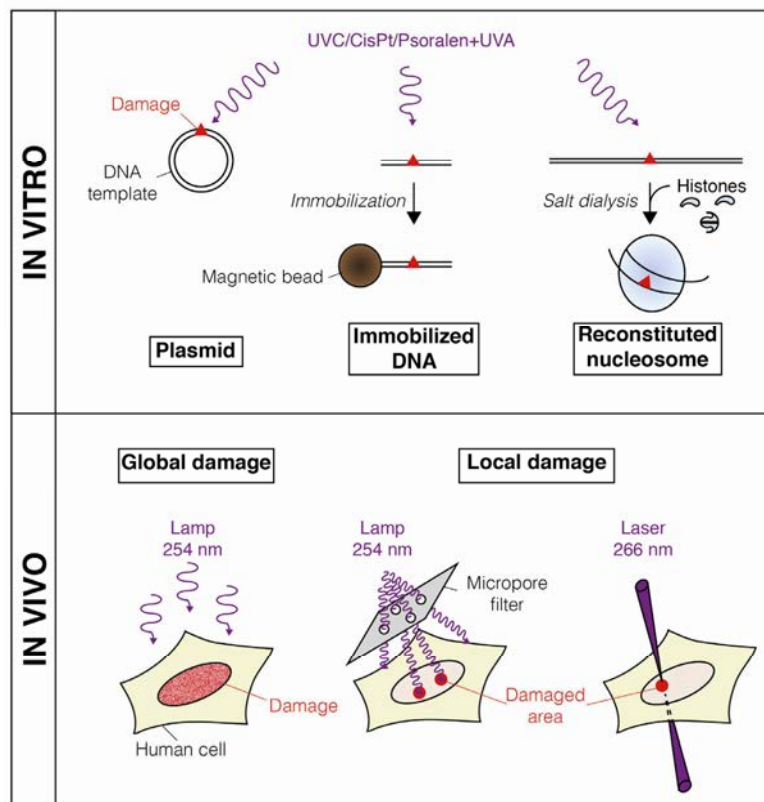
2. Dynamic Changes in Chromatin Structure during Nucleotide Excision Repair

Over the past decades, a series of methods have been developed both *in vitro* and *in vivo* to assess histone and nucleosome dynamics coupled to NER (Figures 1–3), considerably increasing our understanding of chromatin rearrangements during the NER process.

2.1. DNA Damage-Induced Nucleosome Destabilization and Histone Mobilization

The NER pathway is involved in the repair of pyrimidine dimers and bulky DNA adducts that can be induced either in cultured cells or on DNA templates by irradiation with UVC light or treatment with cross-linking agents like Cisplatin (CisPt) or UVA-activated psoralen (Figure 1). Pyrimidine dimers can also be formed by chemical synthesis [18].

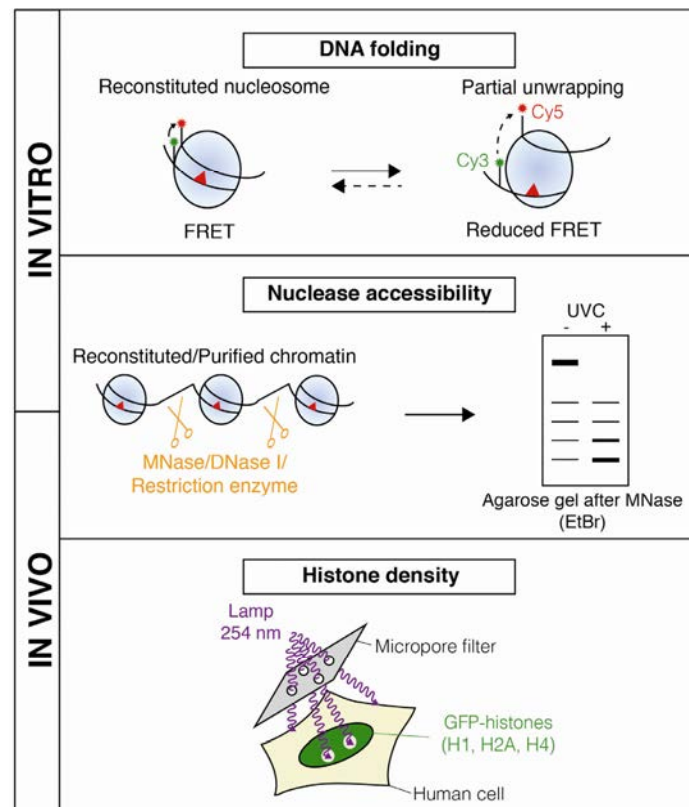
Figure 1. Methods for inducing DNA damage repaired by the Nucleotide Excision Repair (NER) pathway. When not chemically synthesized, DNA lesions (*i.e.*, pyrimidine dimers and bulky DNA adducts, red triangles) are generally induced by exposure to UV light and/or cross-linking agents (purple). Genotoxic treatment is applied on DNA templates (*in vitro*) or on cultured human cells (*in vivo*). Damaged DNA templates are further immobilized onto magnetic beads [19] or used to reconstitute nucleosome particles by salt dialysis [20,21]. Global cell irradiation with a UVC lamp generates DNA damage throughout the nucleus. Localized DNA damage is induced by irradiating cells with a UVC lamp through a micropore filter [22–24] or by focusing a UVC laser to specific sub-nuclear regions [25].



Early work studying how the NER pathway repairs UVC lesions on naked DNA revealed that, despite the short size of the repair patch (about 30 nucleotides in length) [26], access to at least 100 base pairs flanking the lesion was needed for the repair machinery to excise the damaged oligonucleotide [27]. These early observations suggested that, *in vivo*, the chromatin structure should

be rearranged in order for repair factors to process UVC lesions. Formal proof of chromatin reorganization upon DNA damage was obtained by measuring chromatin accessibility to nucleases, which preferentially cleave the DNA between nucleosome particles (Figure 2). Pioneering experiments using partial MNase (Micrococcal Nuclease) digestion on chromatin purified from UVC-irradiated human fibroblasts [28] showed that chromatin regions undergoing NER present a transient increase in nuclease sensitivity. These initial observations were further confirmed by using other nucleases such as DNase I (DNA Nuclease 1) [29] or restriction enzymes [30].

Figure 2. Methods for measuring chromatin disorganization upon UVC damage. Spontaneous changes in DNA folding in reconstituted nucleosomes containing UV photoproducts (red triangles) is measured by FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) between the donor (Cy3) and acceptor (Cy5) fluorophores [21]. Chromatin rearrangements upon UVC damage can also be assessed by probing the accessibility of damaged DNA to nucleases (orange scissors), which is performed either on reconstituted chromatin (*in vitro*) or on chromatin purified from damaged cells (*in vivo*). The accumulation of small DNA fragments, indicative of disorganized chromatin (by nucleosome disruption and/or random positioning), is visualized by electrophoresis on an agarose gel stained with Ethidium Bromide (EtBr) [28,29,31]. *In vivo*, changes in histone density can be visualized by a decrease in fluorescent signal at sites of local UVC damage in cultured human cells expressing GFP-tagged histones (green) [32].



Evidence of altered chromatin organization in the presence of UV photoproducts was recently obtained at the nucleosome scale. The FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) technology has been adapted to follow spontaneous alterations in the folding of UV-damaged DNA in reconstituted nucleosomes (Figure 2). FRET efficiency is reduced in a UV dose-dependent manner showing that UV damaged nucleosomes remain partially unwrapped for longer times compared to undamaged nucleosomes. These data highlight that UV damage itself can cause changes in DNA wrapping around the histone octamer *in vitro*, which potentially facilitates access for repair machineries to DNA lesions *in vivo* [21].

In addition to the spontaneous dynamics of UV-damaged nucleosomes, active mechanisms also promote chromatin disorganization around UVC lesions, as recently visualized *in vivo* by locally irradiating cells through micropore filters (Figures 1 and 2). Human cells expressing fluorescently-labeled histones showed a decrease in fluorescence intensity at damage sites in an ATP (Adenosine TriPhosphate)-dependent manner, revealing that histone density is locally reduced by an active mechanism [32]. Whether this local loss of histones results from a complete disruption of damaged nucleosomes and/or nucleosome sliding away from the lesions is still to be determined.

Besides its likely role in giving access to repair machineries, histone eviction may also be a way to eliminate damaged histones (Figure 4). Indeed, UV irradiation can lead to the production of reactive oxygen species and free radicals via photosensitization mechanisms [33]. Histone proteins oxidized by such reactive molecules may then be targeted for degradation [34]. An alternative possibility is that histones removed from damaged chromatin regions are recycled by histone chaperones (Figure 4) and contribute to chromatin reorganization after DNA repair. Further studies on the fate of displaced histones will be required to understand how the original information conveyed by chromatin via histone variants and modifications can be preserved.

The extent of chromatin disorganization coupled to NER *in vivo* is also intriguing. Several lines of evidence suggest that it spreads far beyond the repair patch, at least up to 2 kilobases from the damage site [35], while another study reports that chromatin rearrangements extend over the whole nucleus following local UVC irradiation [36]. It is still unclear whether structural barriers to chromatin disorganization exist in the cell nucleus. As chromatin organizes itself in specific nuclear domains [3,4], it is conceivable that existing boundaries between these domains may limit spreading of chromatin rearrangements after DNA damage. The extent of chromatin disorganization after damage may also differ between euchromatin and more compact heterochromatin regions. To address these issues, a newly developed UVC laser micro-irradiation technique (Figure 1) would be interesting to use in the future as it provides a means to target the damage to specific sub-nuclear regions [25].

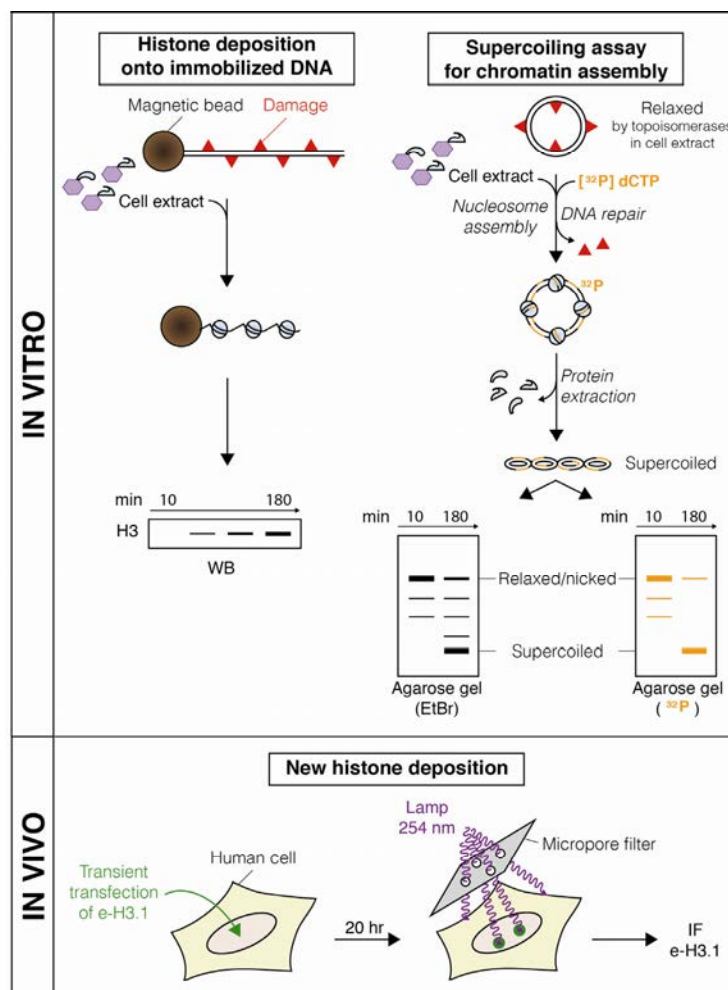
In conclusion, a large body of evidence implicates chromatin disorganization in NER, including damaged nucleosome destabilization and histone displacement, which raises the issue of how chromatin integrity can be preserved.

2.2. Nucleosome Restoration and New Histone Deposition Coupled to NER

The first evidence of chromatin restoration following NER came from nuclease digestion experiments on chromatin purified from UVC-damaged cells as described in the previous section [28,29]. These experiments indeed demonstrated that regions undergoing repair became progressively more nuclease resistant to finally present the same digestion profile as non-damaged chromatin, indicating restoration

of nucleosomal arrays where nucleosomes occupy non-random positions. Furthermore, nucleosome restoration is complete with deposition of linker histone H1 [37] and re-establishment of a canonical DNase I footprint [29].

Figure 3. Methods for measuring chromatin restoration upon UVC damage. Deposition of histone proteins from a cell-free extract onto damaged DNA immobilized on magnetic beads is measured by western blotting (WB) against pulled-down histones [19,31]. Chromatin assembly coupled to NER can also be monitored *in vitro* by supercoiling assays using damaged plasmids mixed with extracts from human cells, xenopus eggs or drosophila embryos that are supplemented with a radioactive desoxyribonucleotide ($[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ which labels repair patches, orange). Within minutes, the plasmid is relaxed by topoisomerases present in the extracts. Nucleosome assembly introduces negative superhelical turns into the relaxed plasmid, which can be detected as faster migrating forms by electrophoresis on an agarose gel stained with Ethidium Bromide (EtBr, total DNA) or revealed by autoradiography (^{32}P , repaired DNA) ([38,39], reviewed in [31]). *In vivo*, new histone deposition at sites of local UVC damage is visualized by immunofluorescence (IF) in cultured human cells transiently expressing epitope-tagged histones (e-H3.1, green) [40].



The coupling between NER and chromatin assembly was then further studied *in vitro* by using supercoiling assays (Figure 3). In these assays, UV or Cisplatin-damaged plasmids are mixed with cell-free extracts supplemented with radioactive desoxyribonucleotides to label repair patches, and analyzed by agarose gel electrophoresis and autoradiography. The accumulation of repaired supercoiled DNA molecules is indicative of nucleosome assembly coupled to NER [38,39].

The analysis of nucleosome dynamics during NER was then taken one step further by examining the role of specific histone variants. Indeed, most histones exist as distinct variants which differ in their amino-acid sequences, their expression profiles, and their timing and/or sites of incorporation into chromatin [5]. So far, the efforts towards investigating histone variant dynamics coupled to NER have been focused on the replicative H3.1 variant that is synthesized mostly in S phase and incorporated into nucleosomes in a DNA synthesis-coupled manner. *In vitro* experiments demonstrated that epitope-tagged H3.1 histone is deposited onto immobilized UV-damaged templates [41] (Figure 3). These data were then further strengthened *in vivo* in human cells transiently expressing Flag-HA-tagged H3.1. Upon local UVC irradiation, newly synthesized H3.1 histones accumulate at damage sites in a manner coupled to repair synthesis [40]. This study puts forward new H3.1 histone incorporation as critical in chromatin restoration after repair of UVC lesions (Figure 5).

Although it presumably helps restoring nucleosomal structure at damage sites, the incorporation of new histones challenges the maintenance of chromatin integrity. Indeed, newly synthesized soluble histones are known to bear post-translational modifications that differ from nucleosomal histones [42] and thus, deposition of new histones could lead to substantial changes in the chromatin landscape in repaired regions. Whether such changes are only transient or longer-term, leaving an imprint on chromatin, is an issue that clearly deserves further investigation. Notably, the dynamics of pre-existing histones and other variants also needs to be considered, and histone deposition at earlier steps in the NER process cannot be excluded. Further investigation of histone variant dynamics coupled to NER *in vivo* should now be possible by exploiting SNAP-tag-based pulse-chase imaging, a powerful technique that allows tracking new or old histones in live cells and quantifying their turnover [43–46].

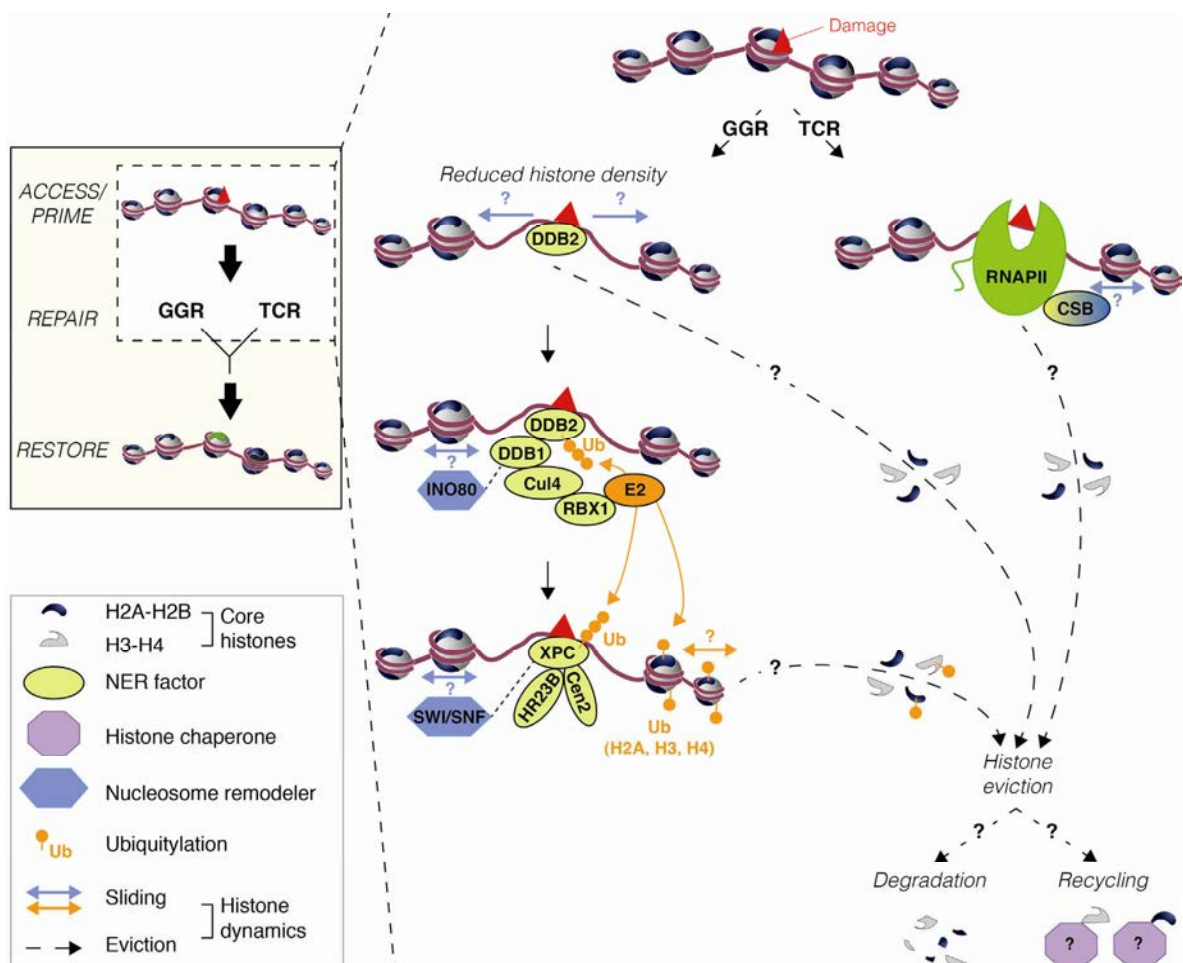
Altogether, studies of chromatin dynamics coupled to NER reveal that chromatin undergoes dramatic changes in its organization during the repair process, involving nucleosome rearrangements and mobilization of histone proteins. Identifying the molecular players in these processes has been the focus of intense research, providing interesting mechanistic insights into histone dynamics coupled to NER, which we describe in the following section.

3. Mechanisms Underlying Histone Dynamics during Nucleotide Excision Repair

3.1. Chromatin Accessibility and Histone Post-Translational Modifications

Histone modifications play central roles in regulating chromatin dynamics not only during transcription but also in the context of DNA repair [7]. Historically, acetylation was the first histone post-translational modification shown to promote UV-damaged chromatin accessibility and to stimulate NER, as reported in yeast and mammalian cells (reviewed in [47] and by R. Waters and colleagues in this issue).

Figure 4. Histone dynamics at early steps of NER in mammals. The GGR (Global Genome Repair) factor DDB2 is recruited to the lesion (red triangle), where it promotes chromatin decompaction and histone displacement [32]. In conjunction with DDB1, Cul4 and RBX1, DDB2 forms an E3-ubiquitin ligase complex, which triggers ubiquitylation (orange) of several substrates. In particular, various core histones (H2A, H3 and H4) are ubiquitylated [48–53], which is thought to destabilize nucleosome structure and to promote histone loss from damaged chromatin [49,54]. The fate of histones displaced from damaged chromatin regions (degradation or recycling by histone chaperones) is still under investigation. In addition to a possible eviction of histones from damaged nucleosomes, histone dynamics during NER likely involves histone mobilization/sliding by nucleosome remodeling factors such as INO80, likely recruited via its interaction with DDB1 [55] and SWI/SNF, recruited concomitantly with the GGR factor XPC [56–59]. In addition to their association with repair factors, binding to DNA damage-induced histone modifications could be another mechanism for recruiting chromatin remodelers. During TCR (Transcription Coupled Repair), stalled RNAPII (green) is recognized by CSB, a SWI/SNF-like ATPase whose function in chromatin remodeling *in vivo* is still unclear [60].



Studying how the NER machinery processes DNA lesions also revealed the importance of protein ubiquitylation in coordinating the NER response (for review, see [61]). Interestingly, in addition to various NER factors, H2A, H3 and H4 histones are ubiquitylated in the course of NER in mammals [48–53]. By examining H3 and H2A extractability from damaged chromatin *in vitro* and *in vivo* [49,54], histone ubiquitylation was shown to destabilize nucleosomal organization, suggesting that this modification could facilitate access to damaged chromatin *in vivo* by promoting histone displacement from damaged nucleosomes (Figure 4). Whether ubiquitylation alone is sufficient for increasing chromatin accessibility or if it acts as a signal for recruiting chromatin remodelers and/or histone chaperones is still to be determined.

The mechanisms for how this modification is established in response to UVC damage and coupled with NER are still under investigation. Several E3 ubiquitin ligases acting at different steps of the NER pathway have been identified as histone modifiers. First, by taking advantage of NER-deficient cell lines established from XPE (Xeroderma Pigmentosum E) patients, the E3 ubiquitin ligase complex RBX1 (Ring-BoX 1)-Cul4 (Cullin 4)-DDB1-DDB2 (DNA Damage Binding protein), a key player in UVC damage detection, was shown to ubiquitylate H2A *in vitro* and *in vivo* [48,50] (Figure 4). This complex is also involved in H3 and H4 ubiquitylation stimulated by UVC irradiation [49]. In addition, H2A was found to be ubiquitylated by the ubiquitin ligase RNF2 (Ring finger protein 2) in a manner dependent on the NER factor XPA [51]. The ubiquitin ligase RNF8 (Ring finger protein 8) also modifies H2A upon formation of singled stranded DNA, an NER intermediate resulting from lesion processing [53]. While the multiplicity of E3 ubiquitin ligases involved in modifying H2A complicates the analysis of its function in the NER pathway, it clearly underlines a critical role of this modified histone in this process. Finally, H2A ubiquitylation has been proposed to occur after repair synthesis and to be dependent on the H3.1 histone chaperone CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1) [52]. In this context, histone ubiquitylation, reported to destabilize nucleosomes, might help remodelers to reposition newly formed nucleosomes and could thus be an important player in chromatin restoration upon UVC irradiation (Figure 5). Future experiments will help clarify this issue and define the role of this modification in chromatin rearrangements coupled to early and late NER steps.

In conclusion, histone modifications by acetylation and ubiquitylation have emerged as key regulators of chromatin accessibility during NER. How they potentially crosstalk with other factors involved in chromatin dynamics such as remodelers and histone chaperones will be important to consider.

3.2. Nucleosome Mobilization by Chromatin Remodeling Factors

Chromatin remodelers use the energy of ATP hydrolysis to disrupt histone-DNA contacts, thus promoting nucleosome sliding, removal or exchange [9,10]. Remodeling factors were first identified as key regulators of gene expression, and it is only recently that their role in DNA damage response pathways has been investigated (reviewed in [62]).

In mammalian cells, both SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non Fermentable) and INO80 (INOsitol requiring 80) remodeling factors stimulate NER as their down-regulation confers hypersensitivity to UVC, associated with inefficient removal of UV damage and impaired recruitment of early/intermediate NER factors [55–59]. The coupling between remodelers and NER factors is further supported by co-immunoprecipitation experiments revealing interactions between the SWI/SNF

complex subunits BRG1 (Brahma-Related Gene 1) and SNF5/INI1 (Integrase Interactor 1) with XPC [57,59] and between INO80 and DDB1 [55] (Figure 4). Additionally, the first hints towards a possible involvement of other mammalian chromatin remodelers in NER started to emerge with members of the CHD (Chromodomain Helicase DNA binding protein) and ISWI (Imitation SWItch) families whose loss of function sensitizes cells to UVC irradiation [62,63].

However, the precise role of these remodelers at UV damage sites is still an open issue. Such factors likely help reorganize the chromatin structure for repair machineries to have access to DNA damage. While BRG1 and to a lesser extent INO80 were shown to increase chromatin accessibility upon global UV irradiation in human cells as revealed by MNase digestion profiles [55,57], it is not formally demonstrated that such factors actually promote nucleosome remodeling locally at DNA damage sites. Whether different remodelers fulfill distinct/complementary functions at damage sites (*i.e.*, nucleosome sliding *vs.* disruption) is another issue that warrants further investigation.

Besides well-defined chromatin remodelers, some NER factors also display nucleosome remodeling activity. In mammals, CSB (Cockayne Syndrome B), a NER factor involved in repair of UV damage on transcribed DNA strands, contains a SWI/SNF ATPase domain and was shown to remodel chromatin *in vitro*, but the relevance of this activity *in vivo* still needs to be addressed [60] (Figure 4). Additionally, a recent study revealed that the UV damage recognition factor DDB2 promotes chromatin decompaction and ATP-dependent histone displacement from sites of local UVC irradiation ([32], Figure 4). Notably, this function is independent of the E3 ubiquitin ligase activity of the CUL4-DDB complex and does not rely on SWI/SNF remodelers. The mechanisms underlying DDB2-mediated chromatin remodeling at damage sites are still unclear and most likely mediated by remodeling factor(s) yet to be identified.

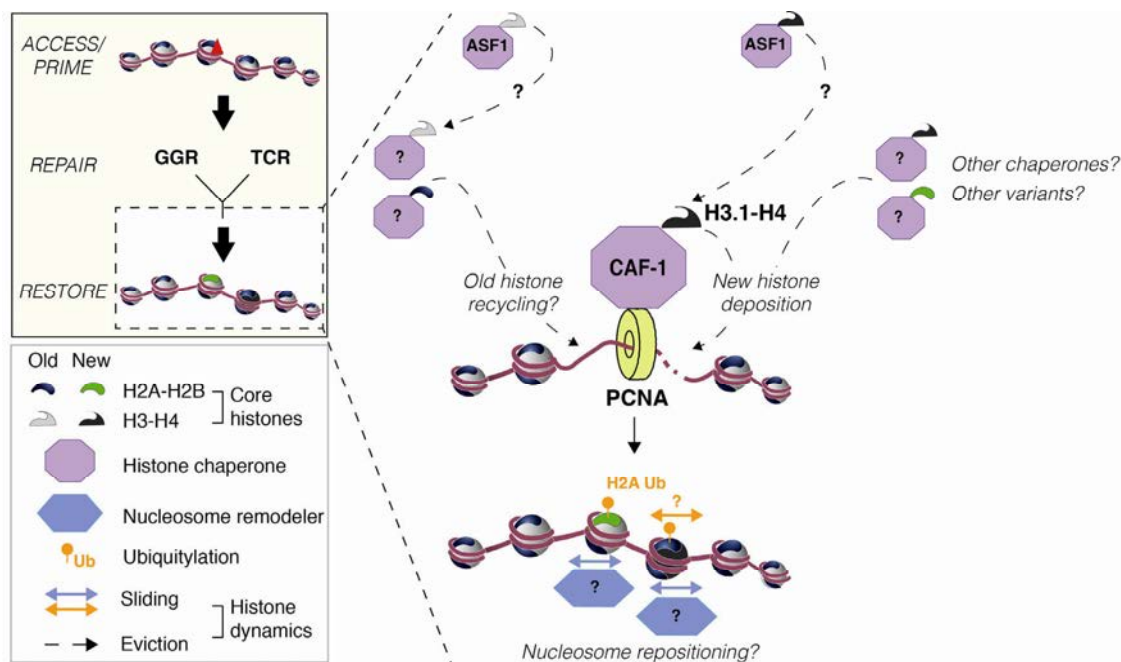
Altogether, current studies mainly support a role for remodelers in promoting chromatin accessibility by moving histones/nucleosomes away from the damage site. Nevertheless, this does not exclude a possible function during chromatin restoration in cooperation with histone chaperones.

3.3. Histone Mobilization by Histone Chaperones

Histone chaperones are key players in histone metabolism involved in escorting histones and mobilizing them in and out of chromatin [11,12]. The list of known histone chaperones has been growing significantly, but only a few have been associated with the DNA damage response (reviewed in [16,64]) and CAF-1 is the only one with a well-described role in the context of NER in mammalian cells. CAF-1 is an evolutionarily conserved complex, initially identified by its ability to promote histone deposition coupled to DNA replication [65,66] and characterized later as a chaperone dedicated to the replicative H3.1 variant [41,45]. Notably, CAF-1 function is not restricted to replication, as it is recruited to DNA damage sites during late steps of NER as shown *in vitro* and in human cells [67–69]. Interestingly, consistent with a late recruitment in NER, CAF-1 is not required *per se* for efficient repair of UV lesions or for the recruitment of NER factors to damage in human cells [40]. Its function during NER was elucidated by a series of *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrating that this histone chaperone promotes chromatin restoration coupled to NER by depositing newly synthesized H3.1 histones at damage sites in a repair-synthesis dependent manner [38,40,41] (Figure 5). The direct interaction of CAF-1 with the polymerase sliding clamp

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) provides molecular support for a coupling between chromatin re-assembly and DNA synthesis both during replication and repair [67,70].

Figure 5. Histone dynamics at late steps of NER in mammals. Newly synthesized H3.1 histone variants in dimers with H4 (black) are deposited at UVC damage sites [40,41]. *De novo* histone deposition is coupled to repair synthesis via a direct interaction between the specific H3.1 histone chaperone CAF-1 (purple) and the polymerase sliding clamp PCNA (yellow) [67]. The chaperone ASF-1 may be a donor of new H3.1 for CAF-1 and/or contribute to old histone recycling. The involvement of other histone variants and other chaperones in the new histone deposition process is still to be determined. The contribution of old histone recycling is also an open issue. H2A is ubiquitylated (orange) in a CAF-1-dependent manner [52]. This modification, reported to destabilize nucleosome structure [54], might contribute in concert with nucleosome remodelers (blue) to re-position newly formed nucleosomes after repair.



In conclusion, the histone chaperone CAF-1 stands out as a key factor in chromatin restoration coupled to late NER via its ability to deposit new H3.1 histones at damage sites (Figure 5). The contribution of other histone chaperones to this process is still to be determined. In this respect, ASF-1 (Anti-Silencing Function 1) is an interesting candidate as it functions synergistically with CAF-1 to assemble nucleosomes during NER *in vitro* [71] and helps turning off the DNA damage checkpoint after UV irradiation both in yeast and mammalian cells [72,73]. It is thus possible that ASF-1 acts as a donor of new histones for CAF-1 in chromatin restoration coupled to NER (Figure 5). Another attractive possibility is that ASF1 could be involved in old histone recycling at damage sites (Figure 5) as described at the replication fork [74]. Future studies may also give more insights into the composition of nucleosomes formed upon repair-coupled chromatin restoration by determining whether histone variants other than H3.1 get deposited at NER sites.

4. Conclusions and Open Issues

As reviewed here and summarized in the Access/Prime-Repair-Restore model [13–16], the NER response induces dramatic chromatin structural changes, which involve histone modification and mobilization at various steps of the NER pathway. The underlying molecular mechanisms and the functional relevance of chromatin dynamics during NER are topics of intense research. Chromatin rearrangements at early stages of NER expose DNA damage to NER machineries and may also facilitate the removal of damaged histone proteins. Such disorganization of chromatin most likely results from both histone eviction by nucleosome disruption and nucleosome sliding away from DNA lesions. It is achieved by the concerted action of NER factors involved in UV damage detection, histone modifiers and chromatin remodeling factors (Figure 4). After DNA damage processing, chromatin re-assembly involves a coupling between late NER factors and histone chaperones incorporating new H3.1 histones at damage sites (Figure 5).

Nevertheless, many aspects of chromatin dynamics during NER are still unresolved. In particular, the roles of histone modifiers, nucleosome remodelers, and histone chaperones during NER have been mostly considered separately and at specific repair steps. Thus, a future challenge in the field will be to understand how the different players involved in damaged chromatin dynamics work together in a coordinated fashion. Distinct players might also be involved depending on the type of damage inflicted. It would thus be interesting to analyze potential differences in histone dynamics among the several DNA repair pathways. Another critical issue will be to determine whether and how chromatin disorganization and restoration are coupled. This may help to understand how the information conveyed by chromatin organization is preserved upon repair of DNA damage. As discussed above, new histone incorporation at damage sites is likely to modify, at least transiently, the information encoded by chromatin structure via alterations in patterns of histone variants and modifications. Since these chromatin marks play critical roles in transcription regulation, any change at this level may impact on the expression of the genes in the damaged chromatin region. To assess the extent of such changes, it will be important to determine the relative proportions of new and old histones involved in chromatin reorganization following NER. How long these new histones persist at repair sites and whether they could mark chromatin regions that have been damaged is another important question that needs to be addressed.

Finally, the impact of chromatin higher-order structures on NER and the dynamics and functions of non histone proteins during this process would be interesting to explore in future studies. Indeed, the importance of non histone chromatin proteins was recently revealed in the response to DNA double-strand breaks with several reports underlining how repair of DNA damage proceeds in compact heterochromatin domains (reviewed in [16]). The role of non histone chromatin-associated proteins in NER started to be analyzed in human cells and *C. elegans*, with evidence for an involvement of HP1 family members (Heterochromatin Protein 1) in the response to UV damage [75]. How silenced heterochromatin-like structures impede the NER process has been addressed only in yeast so far [76,77]. Future work should shed light on the interplay between NER and chromatin, to decipher not only how NER modulates chromatin structure but also how distinct chromatin organization levels differentially regulate NER.

Acknowledgments

We thank Geneviève Almouzni, Zachary Gurard-Levin and Gaston Soria for critical reading of the manuscript. S.A. is recipient of a PhD fellowship from University Pierre & Marie Curie and S.E.P. is funded by a Marie Curie Intra-European fellowship and the Institut national de la santé et de la recherche médicale. Their work is supported by grants to G.A.'s laboratory.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kornberg, R.D. Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 931–954.
2. Luger, K.; Mäder, A.W.; Richmond, R.K.; Sargent, D.F.; Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **1997**, *389*, 251–260.
3. Probst, A.V.; Dunleavy, E.; Almouzni, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 192–206.
4. Li, G.; Reinberg, D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2011**, *21*, 175–186.
5. Talbert, P.B.; Henikoff, S. Histone variants—Ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 264–275.
6. Talbert, P.B.; Ahmad, K.; Almouzni, G.; Ausió, J.; Berger, F.; Bhalla, P.L.; Bonner, W.M.; Cande, W.Z.; Chadwick, B.P.; Chan, S.W.L.; *et al.* A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics Chromatin* **2012**, *5*, doi:10.1186/1756-8935-5-7.
7. Bannister, A.J.; Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **2011**, *21*, 381–395.
8. Luger, K.; Dechassa, M.L.; Tremethick, D.J. New insights into nucleosome and chromatin structure: An ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 436–447.
9. Flaus, A.; Owen-Hughes, T. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: The means to the end. *FEBS J.* **2011**, *278*, 3579–3595.
10. Hargreaves, D.C.; Crabtree, G.R. ATP-dependent chromatin remodeling: Genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res.* **2011**, *21*, 396–420.
11. De Koning, L.; Corpet, A.; Haber, J.E.; Almouzni, G. Histone chaperones: An escort network regulating histone traffic. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 997–1007.
12. Avvakumov, N.; Nourani, A.; Côté, J. Histone chaperones: Modulators of chromatin marks. *Mol. Cell* **2011**, *41*, 502–514.
13. Smerdon, M.J. DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1991**, *3*, 422–428.
14. Green, C.M.; Almouzni, G. When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 28–33.
15. Groth, A.; Rocha, W.; Verreault, A.; Almouzni, G. Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* **2007**, *128*, 721–733.

16. Soria, G.; Polo, S.E.; Almouzni, G. Prime, repair, restore: The active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol. Cell* **2012**, *46*, 722–734.
17. Nospikel, T. DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: Variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 994–1009.
18. Taylor, J.S.; Brockie, I.R.; O'Day, C.L. A building block for the sequence-specific introduction of *cis*-syn thymine dimers into oligonucleotides. Solid-phase synthesis of TpT[c,s]pTpT. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6735–6742.
19. Mello, J.A.; Moggs, J.G.; Almouzni, G. Analysis of DNA repair and chromatin assembly *in vitro* using immobilized damaged DNA substrates. *Methods Mol. Biol.* **2006**, *314*, 477–487.
20. Ura, K.; Araki, M.; Saeki, H.; Masutani, C.; Ito, T.; Iwai, S.; Mizukoshi, T.; Kaneda, Y.; Hanaoka, F. ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes. *EMBO J.* **2001**, *20*, 2004–2014.
21. Duan, M.-R.; Smerdon, M.J. UV damage in DNA promotes nucleosome unwrapping. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 26295–26303.
22. Katsumi, S.; Kobayashi, N.; Imoto, K.; Nakagawa, A.; Yamashina, Y.; Muramatsu, T.; Shirai, T.; Miyagawa, S.; Sugiura, S.; Hanaoka, F.; *et al.* *In situ* visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *117*, 1156–1161.
23. Moné, M.J.; Volker, M.; Nikaido, O.; Mullenders, L.H.; van Zeeland, A.A.; Verschure, P.J.; Manders, E.M.; van Driel, R. Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 1013–1017.
24. Guerrero-Santoro, J.; Levine, A.S.; Rapić-Otrin, V. Co-localization of DNA repair proteins with UV-induced DNA damage in locally irradiated cells. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *682*, 149–161.
25. Dinant, C.; de Jager, M.; Essers, J.; van Cappellen, W.A.; Kanaar, R.; Houtsmuller, A.B.; Vermeulen, W. Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 2731–2740.
26. Edenberg, H.; Hanawalt, P. Size of repair patches in the DNA of ultraviolet-irradiated HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *272*, 361–372.
27. Huang, J.C.; Sancar, A. Determination of minimum substrate size for human excinuclease. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19034–19040.
28. Smerdon, M.J.; Lieberman, M.W. Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA-repair synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 4238–4241.
29. Smerdon, M.J.; Lieberman, M.W. Distribution within chromatin of deoxyribonucleic acid repair synthesis occurring at different times after ultraviolet radiation. *Biochemistry* **1980**, *19*, 2992–3000.
30. Gong, F.; Fahy, D.; Smerdon, M.J. Rad4-Rad23 interaction with SWI/SNF links ATP-dependent chromatin remodeling with nucleotide excision repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 902–907.
31. Gérard, A.; Polo, S.E.; Roche, D.; Almouzni, G. Methods for studying chromatin assembly coupled to DNA repair. *Meth. Enzymol.* **2006**, *409*, 358–374.
32. Luijsterburg, M.S.; Lindh, M.; Acs, K.; Vrouwe, M.G.; Pines, A.; van Attikum, H.; Mullenders, L.H.; Dantuma, N.P. DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J. Cell Biol.* **2012**, *197*, 267–281.

33. Pattison, D.I.; Davies, M.J. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *Experientia Supplementum* **2006**, *96*, 131–157.
34. Bader, N.; Grune, T. Protein oxidation and proteolysis. *Biol. Chem.* **2006**, *387*, 1351–1355.
35. Mathis, G.A.; Althaus, F.R. Isolation of 8-methoxypsoralen accessible DNA domains from chromatin of intact cells. *Cell Biol. Toxicol.* **1990**, *6*, 35–45.
36. Rubbi, C.P.; Milner, J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J.* **2003**, *22*, 975–986.
37. Smerdon, M.J.; Watkins, J.F.; Lieberman, M.W. Effect of histone H1 removal on the distribution of ultraviolet-induced deoxyribonucleic acid repair synthesis within chromatin. *Biochemistry* **1982**, *21*, 3879–3885.
38. Gaillard, P.H.; Martini, E.M.; Kaufman, P.D.; Stillman, B.; Moustacchi, E.; Almouzni, G. Chromatin assembly coupled to DNA repair: A new role for chromatin assembly factor I. *Cell* **1996**, *86*, 887–896.
39. Gaillard, P.H.; Moggs, J.G.; Roche, D.M.; Quivy, J.P.; Becker, P.B.; Wood, R.D.; Almouzni, G. Initiation and bidirectional propagation of chromatin assembly from a target site for nucleotide excision repair. *EMBO J.* **1997**, *16*, 6281–6289.
40. Polo, S.E.; Roche, D.; Almouzni, G. New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* **2006**, *127*, 481–493.
41. Tagami, H.; Ray-Gallet, D.; Almouzni, G.; Nakatani, Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **2004**, *116*, 51–61.
42. Loyola, A.; Bonaldi, T.; Roche, D.; Imhof, A.; Almouzni, G. PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol. Cell* **2006**, *24*, 309–316.
43. Jansen, L.E.T.; Black, B.E.; Foltz, D.R.; Cleveland, D.W. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell Biol.* **2007**, *176*, 795–805.
44. Dunleavy, E.M.; Almouzni, G.; Karpen, G.H. H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G₁ phase. *Nucleus* **2011**, *2*, 146–157.
45. Ray-Gallet, D.; Woolfe, A.; Vassias, I.; Pellentz, C.; Lacoste, N.; Puri, A.; Schultz, D.C.; Pchelintsev, N.A.; Adams, P.D.; Jansen, L.E.T.; *et al.* Dynamics of histone h3 deposition *in vivo* reveal a nucleosome gap-filling mechanism for h3.3 to maintain chromatin integrity. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 928–941.
46. Bodor, D.L.; Rodríguez, M.G.; Moreno, N. Analysis of protein turnover by quantitative SNAP-based pulse-chase imaging. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2012**, *55*, 8.8.1–8.8.34.
47. Reed, S.H. Nucleotide excision repair in chromatin: Damage removal at the drop of a HAT. *DNA Repair* **2011**, *10*, 734–742.
48. Kapetanaki, M.G.; Guerrero-Santoro, J.; Bisi, D.C.; Hsieh, C.L.; Rapić-Otrin, V.; Levine, A.S. The DDB1-CUL4ADDDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2588–2593.
49. Wang, H.; Zhai, L.; Xu, J.; Joo, H.-Y.; Jackson, S.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Xiong, Y.; Zhang, Y. Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol. Cell* **2006**, *22*, 383–394.

50. Guerrero-Santoro, J.; Kapetanaki, M.G.; Hsieh, C.L.; Gorbachinsky, I.; Levine, A.S.; Rapić-Otrin, V. The cullin 4B-based UV-damaged DNA-binding protein ligase binds to UV-damaged chromatin and ubiquitinates histone H2A. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 5014–5022.
51. Bergink, S.; Salomons, F.A.; Hoogstraten, D.; Groothuis, T.A.M.; de Waard, H.; Wu, J.; Yuan, L.; Citterio, E.; Houtsmuller, A.B.; Neefjes, J.; *et al.* DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1343–1352.
52. Zhu, Q.; Wani, G.; Arab, H.H.; El-Mahdy, M.A.; Ray, A.; Wani, A.A. Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damaged genomic sites. *DNA Repair* **2009**, *8*, 262–273.
53. Marteiijn, J.A.; Bekker-Jensen, S.; Mailand, N.; Lans, H.; Schwertman, P.; Gourdin, A.M.; Dantuma, N.P.; Lukas, J.; Vermeulen, W. Nucleotide excision repair-induced H2A ubiquitination is dependent on MDC1 and RNF8 and reveals a universal DNA damage response. *J. Cell Biol.* **2009**, *186*, 835–847.
54. Lan, L.; Nakajima, S.; Kapetanaki, M.G.; Hsieh, C.L.; Fagerburg, M.; Thickman, K.; Rodriguez-Collazo, P.; Leuba, S.H.; Levine, A.S.; Rapić-Otrin, V. Monoubiquitinated H2A destabilizes photolesion-containing nucleosomes with the concomitant release of the UV-damaged DNA-binding protein E3 ligase. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 12036–12049.
55. Jiang, Y.; Wang, X.; Bao, S.; Guo, R.; Johnson, D.G.; Shen, X.; Li, L. INO80 chromatin remodeling complex promotes the removal of UV lesions by the nucleotide excision repair pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 17274–17279.
56. Gong, F.; Fahy, D.; Liu, H.; Wang, W.; Smerdon, M.J. Role of the mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complex in the cellular response to UV damage. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1067–1074.
57. Zhao, Q.; Wang, Q.-E.; Ray, A.; Wani, G.; Han, C.; Milum, K.; Wani, A.A. Modulation of nucleotide excision repair by mammalian SWI/SNF chromatin-remodeling complex. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 30424–30432.
58. Zhang, L.; Zhang, Q.; Jones, K.; Patel, M.; Gong, F. The chromatin remodeling factor BRG1 stimulates nucleotide excision repair by facilitating recruitment of XPC to sites of DNA damage. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 3953–3959.
59. Ray, A.; Mir, S.N.; Wani, G.; Zhao, Q.; Battu, A.; Zhu, Q.; Wang, Q.-E.; Wani, A.A. Human SNF5/INI1, a component of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex, promotes nucleotide excision repair by influencing ATM recruitment and downstream H2AX phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 6206–6219.
60. Citterio, E.; van den Boom, V.; Schnitzler, G.; Kanaar, R.; Bonte, E.; Kingston, R.E.; Hoeijmakers, J.H.; Vermeulen, W. ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 7643–7653.
61. Nospikel, T. Multiple roles of ubiquitination in the control of nucleotide excision repair. *Mech. Ageing Dev.* **2011**, *132*, 355–365.
62. Lans, H.; Marteiijn, J.A.; Vermeulen, W. ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics Chromatin* **2012**, *5*, 4.
63. Rajagopalan, S.; Nepa, J.; Venkatachalam, S. Chromodomain helicase DNA-binding protein 2 affects the repair of X-ray and UV-induced DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* **2012**, *53*, 44–50.

64. Ransom, M.; Dennehey, B.K.; Tyler, J.K. Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* **2010**, *140*, 183–195.
65. Smith, S.; Stillman, B. Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication *in vitro*. *Cell* **1989**, *58*, 15–25.
66. Stillman, B. Chromatin assembly during SV40 DNA replication *in vitro*. *Cell* **1986**, *45*, 555–565.
67. Moggs, J.G.; Grandi, P.; Quivy, J.P.; Jónsson, Z.O.; Hübscher, U.; Becker, P.B.; Almouzni, G. A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 1206–1218.
68. Martini, E.; Roche, D.M.; Marheineke, K.; Verreault, A.; Almouzni, G. Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 563–575.
69. Green, C.M.; Almouzni, G. Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair *in vivo*. *EMBO J.* **2003**, *22*, 5163–5174.
70. Shibahara, K.; Stillman, B. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* **1999**, *96*, 575–585.
71. Mello, J.A.; Silljé, H.H.W.; Roche, D.M.J.; Kirschner, D.B.; Nigg, E.A.; Almouzni, G. Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 329–334.
72. Kim, J.-A.; Haber, J.E. Chromatin assembly factors Asf1 and CAF-1 have overlapping roles in deactivating the DNA damage checkpoint when DNA repair is complete. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 1151–1156.
73. Battu, A.; Ray, A.; Wani, A.A. ASF1A and ATM regulate H3K56-mediated cell-cycle checkpoint recovery in response to UV irradiation. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 7931–7945.
74. Groth, A.; Corpet, A.; Cook, A.J.L.; Roche, D.; Bartek, J.; Lukas, J.; Almouzni, G. Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science* **2007**, *318*, 1928–1931.
75. Luijsterburg, M.S.; Dinant, C.; Lans, H.; Stap, J.; Wiernasz, E.; Lagerwerf, S.; Warmerdam, D.O.; Lindh, M.; Brink, M.C.; Dobrucki, J.W.; *et al.* Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J. Cell Biol.* **2009**, *185*, 577–586.
76. Livingstone-Zatchej, M.; Marcionelli, R.; Möller, K.; de Pril, R.; Thoma, F. Repair of UV lesions in silenced chromatin provides *in vivo* evidence for a compact chromatin structure. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37471–37479.
77. Irizar, A.; Yu, Y.; Reed, S.H.; Louis, E.J.; Waters, R. Silenced yeast chromatin is maintained by Sir2 in preference to permitting histone acetylations for efficient NER. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 4675–4686.

Annexe 4 : Perspectives ouvertes par les recherches actuelles sur la dynamique dommages-induite des histones

Chromatin plasticity in response to DNA damage : the shape of things to come.

La plasticité de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN : les futurs défis à relever.

Salomé Adam*, Juliette Dabin*, Sophie E. Polo

DNA Repair, 2015, *sous presse*

* Contribution équivalente

Dans cette revue, nous décrivons :

- (1) Nos connaissances actuelles de la dynamique des histones cœurs du nucléosome en réponse à un stress génotoxique dans les cellules de mammifères. Nous insistons plus particulièrement sur les réponses induites par les lésions générées par les UVC et les cassures double brin de l'ADN.
- (2) Les prochains défis que devra relever la communauté scientifique. La plupart d'entre eux vous ont été présentés dans la partie conclusions & perspectives de mon manuscrit de thèse.



Contents lists available at ScienceDirect

DNA Repair

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dnarepair

Chromatin plasticity in response to DNA damage: The shape of things to come

Salomé Adam^{a b 1}, Juliette Dabin^{a 1}, Sophie E. Polo^{a *}^a Epigenome Integrity Group, UMR 7216 CNRS/Paris Diderot University, 35 rue Helene Brion, 75013 Paris, France^b Chromatin Dynamics Group, UMR 3664 CNRS/Institut Curie Research Center, 26 rue d'Ulm 75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online xxx

Keywords:

Chromatin dynamics
Chromatin remodelers
DNA damage repair
Epigenome maintenance
Histone chaperones
Histone variants

ABSTRACT

DNA damage poses a major threat to cell function and viability by compromising both genome and epigenome integrity. The DNA damage response indeed operates in the context of chromatin and relies on dynamic changes in chromatin organization. Here, we review the molecular bases of chromatin alterations in response to DNA damage, focusing on core histone mobilization in mammalian cells. Building on our current view of nucleosome dynamics in response to DNA damage, we highlight open challenges and avenues for future development. In particular, we discuss the different levels of regulation of chromatin plasticity during the DNA damage response and their potential impact on cell function and epigenome maintenance.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1 Introduction

While the sequential molecular events of the DNA damage response (DDR) have been extensively characterized [1,2], how DNA damage signaling and repair machineries operate on a chromatin substrate is less well understood [3–6]. DNA packaging with histone proteins into nucleosomes and higher-order chromatin structures restricts DNA damage accessibility. This issue is central to the Access–Repair–Restore (ARR) model, which integrates nucleosome dynamics in the repair process [7–9] and constitutes a foundation for studying DDR-related chromatin changes. This model postulates that chromatin is disorganized prior to binding of repair factors on damaged DNA, and then rearranged after repair completion. Restoring chromatin organization and the original information that it conveys – the so-called epigenome – is key for maintaining cell identity.

Histone proteins are major components of the epigenome, because they exist as sequence variants [10,11] and display multiple post-translational modifications (PTMs) [12], the combination of which regulates gene expression and cellular functions. Histone modifications as well as histone dynamics, promoted by histone chaperones [13] and remodeling factors [14], play important regulatory roles in response to DNA damage (reviewed in [15]). Much effort has been invested in exploring the molecular mechanisms of chromatin dynamics in response to genotoxic stress and how they impact on chromatin structure and function. In this review, we discuss the main features and functional consequences of chromatin dynamics at sites of DNA damage, focusing on core histone mobilization in response to DNA breaks and UV damage in mammalian cells, and we highlight open challenges in this rapidly growing field.

2. Main features of histone dynamics at sites of DNA damage

Here, we present our current knowledge of damaged chromatin dynamics at the level of the nucleosome core particle. Both inner and outer core histones display enhanced dynamics at sites of DNA damage induced by site-specific endonucleases, UVA laser micro-irradiation or local UVC irradiation (Table 1). Consistent with the ARR model [7–9], there is increasing evidence for nucleosome destabilization at damage sites, followed by a restoration of nucleosomal organization (Fig. 1).

Abbreviations: ARR, Access–Repair–Restore; ASF1, Anti-Silencing Function 1; ATP, Adenosine triphosphate; CAF-1, Chromatin Assembly Factor-1; CENPA, Centromeric Protein A; ChIP, chromatin immuno-precipitation; DDB2, DNA damage binding protein 2; DDR, DNA damage response; DSB, double-strand break; FACT, Facilitates Chromatin Transcription; HIRA, Histone Regulator A; HR, homologous recombination; NHEJ, Non-Homologous End Joining; PAR, Poly(ADP-ribose); PTM, post-translational modification; TIP60, Tat-Interacting Protein 60; UV (A or C), ultraviolet (A or C).

* Corresponding author. Tel.: +33 1 57 27 89 81; fax: +33 1 57 27 89 12.

E-mail address: sophie.polo@univ-paris-diderot.fr (S.E. Polo).¹ These authors contributed equally to this work.<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.022>

1568-7864/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article in press as: S. Adam, et al., Chromatin plasticity in response to DNA damage: The shape of things to come, DNA Repair (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.022>

Table 1

Core histone dynamics in response to DNA damage (as known in mammalian cells, unless stated otherwise). 53BP1: tumor suppressor p53-binding protein 1; APLF: aprataxin-PNK-like factor; ASF1: Anti-Silencing Function 1; ATM: ataxia telangiectasia mutated; ATR: ataxia telangiectasia, and Rad3-related protein; BRCA1: breast cancer early onset 1; CHRAC14: Chromatin Accessibility Complex 14; DNA-PKcs: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit; HAT1: Histone Acetyl Transferase 1; IR: Ionizing Radiation; MEF: Mouse Embryonic Fibroblasts; PARP: Poly(ADP-ribose) Polymerase; UBC13: Ubiquitin-conjugating protein 13; XPC: Xeroderma Pigmentosum, complementation group C; XRCC4: X-ray cross-complementing group 4.

Core histones	Dynamics at damaged sites	Regulatory factors	Impact on the DNA damage response	References
H2A/H2B (outer core histones)				
H2A–H2B	Loss of H2A–H2B density around DSBs	Nucleolin chaperone	Nucleolin promotes XRCC4 recruitment to DSBs	[19,20]
	Loss of H2A density at UVC damage sites	DDB2, ATP, PARP	DDB2, ATP and PARP promote UVC damage recognition by XPC	[22]
	Enhanced turnover at sites of UVC irradiation	FACT chaperone (SPT16 subunit)	FACT promotes transcription restart after UVC damage	[27]
	De novo incorporation of H2A at UVC damaged sites	FACT chaperone?	?	[27]
H2A.X	Phosphorylated on S139 in the vicinity of DNA damage	ATM, ATR, DNA-PKcs kinases	Docking site for the recruitment of DNA repair and checkpoint proteins	[55]; reviewed in [6]
	Nucleosomal dissociation increased upon H2A.X S139 phosphorylation	FACT chaperone TIP60 acetyltransferase & p400 remodeler (<i>Drosophila</i>)	FACT promotes DSB repair by HR	[25,26,56]
	Increased mobility in damaged chromatin (sites of UVA laser micro-irradiation)	TIP60 acetyltransferase & UBC13 ubiquitin-conjugating enzyme	TIP60 promotes RAD51 recruitment to DSBs	[23,57]
	Increased extractability from bleomycin-damaged chromatin	TIP60 acetyltransferase & p400 remodeler	p400 promotes ubiquitin-dependent DSB signaling and DSB repair by HR	[17,21]
H2A.Z	Accumulation at DSBs at late time points after damage (restricted to silent chromatin?)	p400 remodeler	Role in DSB repair by HR and NHEJ by controlling resection? (conflicting results)	[28,29]
	H2A.Z.2 (not H2A.Z.1) shows increased mobility at sites of UVA laser micro-irradiation	?	H2A.Z.2 promotes DSB repair by HR & survival to IR? (conflicting results)	[24,29]
macroH2A	mH2A1.1 macrodomain is recruited to sites of UVA laser micro-irradiation through PAR binding	PARP1 & APLF chaperone	Local chromatin compaction?	[32,33]
	mH2A1.1 associates with PARylated chromatin at DSBs (not incorporated into nucleosomes)	PARP1	Promotes 53BP1 accumulation, restrains NHEJ?	[30]
	mH2A1.2 accumulates at DSBs after transient depletion	ATM	Promotes chromatin compaction, BRCA1 recruitment and HR	[31]
H2A.Bbd	Accumulates at UVA laser-induced repair foci upon ectopic expression in MEFs	?	?	[34]
H3/H4 (inner core histones)				
H3–H4	Loss of H3–H4 density around DSBs (not in G1)	p400 Remodeler, ASF1 chaperone	p400 Promotes RAD51 recruitment and DSB repair by HR	[20,21]
	Loss of H4 density at UVC damage sites	DDB2, ATP, PARP	DDB2, ATP and PARP promote UVC damage recognition by XPC	[22]
	No enhanced turnover at sites of UVC irradiation			[27]
H3.1	De novo incorporation at UVC damage sites and at sites of UVA laser damage	CAF-1 chaperone	Coupled to repair synthesis but not required for UVC damage signaling and repair	[39]
H3.2	?	CAF-1 chaperone	?	[40]
H3.3	Accumulation at DSBs	HIRA chaperone & HAT1 (H4 acetyltransferase)	HAT1 facilitates RAD51 recruitment and DSB repair by HR	[35]
	De novo incorporation at UVC damage sites	HIRA chaperone	HIRA promotes transcription restart after UVC damage H3.3 promotes replication fork progression after UVC damage (<i>Chicken cells</i>)	[42,44]
CENPA	Accumulation at DSBs? (conflicting results)			[36,37]
	Mistargeted to DSBs in the absence of CHRAC14 (<i>Drosophila</i>)	CHRAC14 (remodeling complex subunit)	Ectopic kinetochore formation & genome instability	[38]
	Not incorporated de novo at UVC damage sites			[42]

Please cite this article in press as: S. Adam, et al., Chromatin plasticity in response to DNA damage: The shape of things to come, DNA Repair (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.022>

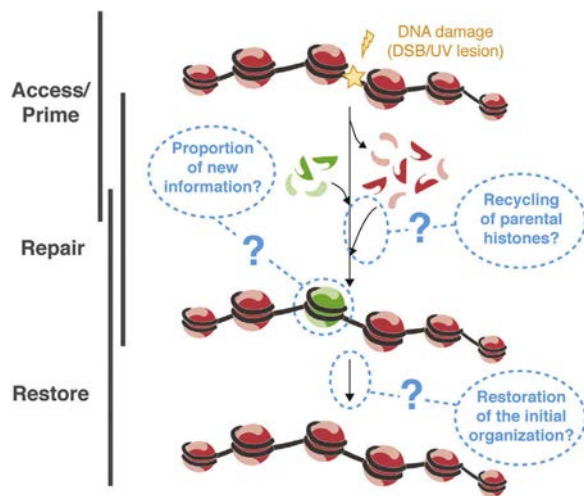


Fig. 1. Histone dynamics in response to DNA damage: the issue of epigenome maintenance.

DNA damage (yellow star) elicits important chromatin rearrangements, including a loss of parental information (red) at the damage site due to the mobilization of pre-existing histones, and the incorporation of new information (green) with DNA damage-responsive PTMs, histone variant exchange and deposition of newly synthesized histones. The resulting pattern of histone variants and associated PTMs is likely to differ substantially from the original one. Future challenges in the field (open issues in blue) will be to determine to which extent the original information is diluted and whether or not the pre-existing chromatin landscape is ultimately faithfully restored after genotoxic stress, by parental histone recycling, histone variant exchange, active erasure of DNA damage-associated PTMs, and/or transmission of parental marks to newly deposited histones.

2.1. Nucleosome destabilization and histone loss from damage sites

Genotoxic stress weakens the interactions between histones and the DNA, as shown by an increase in core histone extractability from chromatin – with some extent of histone solubilization – in response to ionizing radiations, radiomimetic drug treatment, and UVC irradiation [16–18].

Beyond nucleosome destabilization, chromatin immunoprecipitation analyses have revealed a transient loss of core histones in the vicinity of double-strand breaks (DSBs) induced by the I-PpoI endonuclease [19,20]. It needs to be clarified whether such histone loss strictly reflects nucleosome disruption rather than sliding away from DSBs, as we discuss below. Nevertheless, these dynamics involve two histone chaperones: ASF1, which removes the inner core histones H3–H4, and nucleolin, responsible for H2A–H2B mobilization. Nucleolin accumulates at DSBs and plays a crucial role in their repair by stimulating the recruitment of DSB repair factors, suggesting that nucleolin-dependent histone dynamics could be instrumental for proper DSB repair [20].

Besides histone chaperones, chromatin remodelers also contribute to DSB repair and histone mobilization from DSBs, as shown for the p400 remodeler that promotes histone H3 loss from AsiSI-induced DNA breaks and homologous recombination (HR)-mediated repair [21].

Furthermore, histone mobilization is not restricted to the DSB response as it is also observed in UVC-damaged chromatin areas. UVC exposure indeed causes an Adenosine triphosphate (ATP)-dependent reorganization of chromatin, mediated by the UV lesion sensor DNA damage binding protein 2 (DDB2), resulting in reduced density of core and linker histones at sites of UVC irradiation. Whether this reorganization actually corresponds to nucleosome disruption is not known but it correlates with efficient UV dam-

age repair [22]. The ATP-dependency of the process suggests the involvement of DDB2-associated chromatin remodeler(s), yet to be identified.

Altogether these studies support the idea that remodeling chromatin at the nucleosome level, by destabilizing or disrupting nucleosomal organization around DNA damage sites, would facilitate access to repair factors.

2.2. Enhanced histone mobility/turnover at damage sites

Alterations in nucleosomal organization in response to DNA damage also occur through increased mobility and turnover of histone proteins, which may as well answer the need for more accessible chromatin. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analyses have shown that the histone variants H2A.X and H2A.Z.2 display enhanced mobility at sites of UVA laser micro-irradiation within minutes after damage induction [23,24]. Both the histone chaperone Facilitates Chromatin Transcription (FACT) and the acetyltransferase complex Tat Interacting Protein 60 (TIP60) are involved in damage-induced H2A.X dynamics, which is regulated by H2A.X post-translational modifications [23,25,26].

The mobility of core histones has also been studied in response to UVC irradiation by imaging GFP-tagged histones [27]. This recent work shows accelerated turnover of H2A–H2B at UVC damage sites, which is not observed for inner core histones H3.1 and H4. Accelerated turnover of H2A–H2B occurs within minutes after UVC damage and independently of damage repair, suggesting that it may be important for subsequent DDR steps. Once again, the enhanced dynamics of H2A depends on the histone chaperone FACT [27]. Remarkably, this chaperone also promotes transcription recovery after UVC damage repair [27]. Whether this activity results from FACT controlling transcription-coupled repair needs to be clarified but it suggests that histone turnover at early stages of the damage response might have broader consequences than just regulating DNA repair.

2.3. Local enrichment of histone variants at damage sites

Histone turnover can also result in the accumulation of specific histone variants at damage sites, as demonstrated by ChIP at site-specific DSBs or by imaging after local irradiation. This could have a significant impact on the chromatin landscape by changing the histone variant content in damaged nucleosomes, as further discussed below. However, in most cases, we do not have yet a clear view of histone variant accumulation at damage sites because of conflicting reports and evidence is still lacking to fully support the functional relevance of this accumulation.

2.3.1. H2A variants

The H2A histone variant H2A.Z has been found enriched at DNA DSBs [28], although this does not appear to be a widespread chromatin response because it could not be reproduced by another group [29]. H2A.Z enrichment at DSBs might be detectable only at late time points after damage and in poorly transcribed chromatin regions, which originally display low H2A.Z content. The contribution of the H2A.Z variant to DSB repair is also disputed [28,29].

The accumulation of macroH2A1 variants in damaged chromatin regions has been studied in response to DSBs [30,31] and UVA laser micro-irradiation [32]. In particular, the macrodomain-containing form macroH2A1.1 associates with damaged chromatin in a Poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent manner [32,33], but intriguingly without a proper incorporation into nucleosomes as its enrichment at DSBs cannot be detected by ChIP without prior cross-linking [30]. Thus, this variant does not behave like a *bona fide* histone protein in this context but rather like a chromatin-

associated factor. Furthermore, macroH2A1 accumulates at DSBs after being transiently depleted from damaged chromatin [31]. The accumulation of this histone variant on damaged chromatin contributes to DSB repair by HR and local chromatin compaction [31,32]. The effect of macroH2A on repair by compacting rather than opening chromatin is in apparent contrast with the ARR model. We will discuss in the following sections how to reconcile these observations.

Another H2A variant that has been found enriched at sites of UVA laser damage repair is H2A.Bbd [34], but the physiological relevance of this observation is unclear because it relies on the ectopic expression of H2A.Bbd in mouse embryonic fibroblasts while it is normally expressed only in testis and brain cells [31].

2.3.2. H3 variants

Among H3 variants, H3.3 displays increased incorporation around I-SceI-induced DSBs, which is mediated by the histone chaperone Histone Regulator A (HIRA) [35]. This mechanism may be similar to the deposition of newly synthesized H3.3 histones at UVC damage sites (described below).

Although initially reported in human cells, the accumulation of the centromeric H3 variant Centromeric Protein A (CENPA) at DSBs has not been confirmed in recent studies [36,37]. Actually, mis-targeting of CENPA to damage sites may be prevented under normal conditions, as shown in *Drosophila*, to avoid the formation of ectopic kinetochores and genome instability [38].

It remains to be determined if the local enrichment of specific histone variants in damaged chromatin ensures efficient repair by regulating chromatin accessibility/compaction, and/or contributes to restoring chromatin structure and function after repair.

2.4. New histone deposition at damage sites

Damaged chromatin also incorporates new information – at least transiently – via the deposition of newly synthesized histones. The first evidence for *de novo* histone incorporation at DNA damage sites came from analyzing the dynamics of the H3.1 variant short-term after transient transfection in human cells exposed to UVC irradiation or laser micro-irradiation [39]. Using a similar approach, it was also shown that new H2A histones are deposited in UVC-damaged chromatin regions, likely mediated by the histone chaperone FACT [27]. The deposition of newly synthesized H3.1 in UVC-damaged chromatin is promoted by the histone chaperone Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1) [39]. Given that CAF-1 escorts both the H3.1 and H3.2 variants [40], it is likely that a similar mechanism operates for H3.2.

The analysis of new histone dynamics in response to DNA damage has been greatly improved by the development of the SNAP-tag technology [41], which allows specific tracking of newly synthesized histones *in vivo*. Using this approach, it was established that newly synthesized H3.3 variants are deposited by the chaperone HIRA at sites of UVC damage in a manner dependent on DNA damage detection [42], which contrasts with CAF-1-mediated deposition of H3.1 that is coupled to late repair steps [39]. The recent discovery of recurrent point mutations in H3 variants in human cancers (reviewed in [43]) raises questions about the consequences of such mutations on DNA damage-associated histone dynamics, which could contribute to tumor development by compromising epigenome stability.

Beyond restoring nucleosomal structure, new histone deposition at sites of DNA damage also has important functional consequences. While neither H3.1 nor H3.3 deposition seems to impact UVC damage repair [39,42] in human cells, H3.3 plays a substantial role in replication fork progression after DNA damage in chicken cells [44], and the histone chaperone HIRA is required

for transcription recovery upon repair completion in human cells [27,42].

The deposition of new histones at DNA damage sites is consistent with the concept of restoring chromatin structure developed in the ARR model [7–9] and completes our current view of histone dynamics at sites of DNA damage. However, it also raises several issues regarding how DNA damage-induced histone dynamics can be compatible with epigenome maintenance and how they cross-talk with cellular functions. These exciting questions are still open and constitute upcoming challenges in the field, which we discuss in the following sections.

3. Exploring the mechanisms underlying histone dynamics at sites of DNA damage

As described above, there is increasing evidence that, in the early stages of the DDR, histones are mobilized away from damaged chromatin regions. However, it is still unclear whether this occurs as part of chromatin decondensation or if it reflects more profound alterations of chromatin structure affecting nucleosomal integrity. Future work should closely examine whether histones slide away from DNA damage sites as a result of nucleosome remodeling and/or if they are evicted from chromatin due to the disruption – either complete or partial – of damaged nucleosomes. Biochemical approaches, including cell fractionation experiments, should help clarify this issue by determining whether the mobilized histones become soluble or remain chromatin-bound in the vicinity of the damaged area. Note that the extent of nucleosomal alterations may be dependent on the type of DNA damage and repair pathway at work (discussed below). It will also be of major interest to develop imaging tools for tracking displaced histones and determine where they move to after DNA damage. In addition, in-depth analyses of the dynamics of outer and inner core histones will be instrumental for revealing whether they are displaced in a coordinated manner and in which form they are mobilized: single histone, dimer, tetramer, or nucleosome core particle.

Deciphering the molecular bases of nucleosome alterations in response to DNA damage is key for understanding the process of damaged chromatin disorganization and should also provide interesting insights into how chromatin is restored after repair.

4. Impact of DNA damage induced-histone dynamics on epigenome maintenance

DNA damage repair is accompanied by post-translational modification of histones and deposition of new histone species in damaged chromatin regions. The resulting pattern of histone variants and associated PTMs thus likely differs substantially from the chromatin landscape before damage infliction and provides new information, which contributes to signaling and repair of DNA lesions but may also be detrimental for the maintenance of chromatin identity (Fig. 1). Indeed, a memory of the original information should be kept and in this respect, the fate of both parental and newly deposited histones is critical. Are parental histones damaged at sites of DNA lesions and then targeted to degradation, in which case the corresponding information would be lost? Or are they mobilized away from damaged chromatin regions? The latter mechanism would secure the original information by preventing these histones from being targeted by histone modifiers at sites of DNA lesions. Recycling of these parental histones upon DNA repair completion could thus contribute to restoring faithfully the initial chromatin organization. In addition to old histone recycling, re-establishing the original chromatin landscape would require active erasure of the DNA damage-induced histone PTMs and transmission of parental marks to the newly synthesized naive histones deposited at damage sites. Furthermore, it is not yet clear if all the

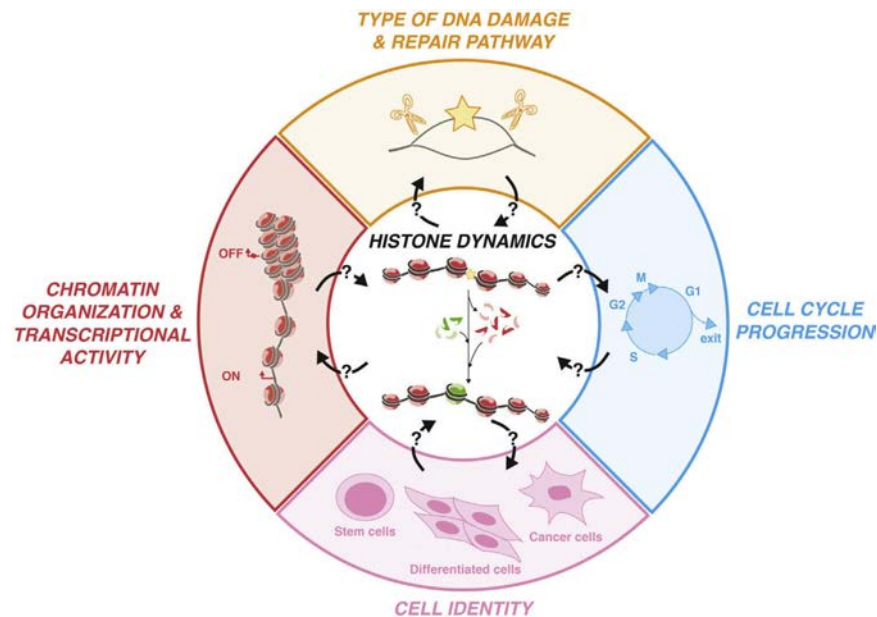


Fig. 2. Cross-talks between histone dynamics in damaged chromatin and cellular functions.

The exchange of parental histones (red) with histones carrying new information (green) in response to DNA damage will impose – at least transient – changes in chromatin structure and function. Future work should closely examine to which extent these dynamics impact DNA metabolic activities (such as DNA repair and transcription) and cellular functions (proliferation and differentiation), and assess their consequences on cell identity. Conversely, it needs to be further explored how the initial chromatin organization, DNA damage type, cell cycle stage, and cell state may regulate DNA damage-induced histone dynamics.

new information deposited in damaged chromatin ultimately gets erased or if it is – at least in part – conserved, leaving an imprint on chromatin, which may serve as a DNA damage memory and facilitate repair in case of a subsequent exposure to DNA damage. Thus, it will be critical to assess the relative contributions of new vs. parental information in repaired nucleosomes. To address this important issue, novel tools such as the SNAP-tag technology [41], which discriminates between new and old histones *in vivo*, should provide experimental means to monitor the fate of newly synthesized histones deposited at damage sites and of parental histones mobilized away from damaged regions. Another powerful technology that could shed light on chromatin composition associated with repaired DNA is nascent chromatin capture, a high-throughput proteomic approach recently developed for investigating the dynamic changes in chromatin-bound proteins and histone PTMs during DNA replication [45]. However, to properly assess the chromatin changes induced by DNA damage, it will be important to have a clear picture of the original chromatin composition before damage infliction, which is not necessarily straightforward with existing technologies.

Thus, we are only beginning to appreciate the full complexity of the mechanisms underlying chromatin integrity in response to DNA damage. Deciphering these mechanisms will be key for understanding how DNA damage impacts on epigenome maintenance and plasticity.

5 Impact of DNA damage induced-chromatin plasticity on the DDR

Despite considerable efforts to elucidate the functional relevance of DNA damage-induced histone dynamics, we are still far from fully understanding the impact of this chromatin plasticity on the DDR. Indeed, studies conducted so far to evaluate the effect of depleting histone variants or their escorting factors on DNA repair have often led to conflicting results (Table 1). Some of these apparent discrepancies may be explained by differences in the cellular

models [42,44] or in the strategies used to deplete the protein of interest [28,29]. Furthermore, it is always questionable whether the resulting phenotype is a direct or indirect consequence of altered histone dynamics.

When analyzing the influence of DNA damage-induced histone dynamics on the DDR, we generally assume that early events facilitate access of repair machineries to damaged DNA, while events coupled to late repair steps contribute to restoring chromatin structure and function without any implication in the DNA repair process. However, this model may be too simplistic because some factors recruited early to damage sites like the histone chaperones FACT and HIRA facilitate transcription recovery after DNA repair completion without substantial effects on DNA damage repair [27,42].

Another matter of debate is how to reconcile the ARR model with reports of chromatin compaction upon genotoxic stress [31,32]. Recent data indicate that DNA damage-induced chromatin relaxation and compaction may represent sequential events in the repair process. First, chromatin would be rapidly relaxed to allow efficient detection of DNA lesions [31,32,46], which is fully consistent with our current view of the ARR model. Then, chromatin would be transiently condensed to promote DNA damage signaling, as shown after DSB induction [46,47]. In addition to this tight temporal control, the compaction status of damaged chromatin may be spatially regulated. Indeed, high resolution profiling of chromatin compaction in live cells by measuring EGFP molecular flow recently revealed that chromatin structure becomes transiently more accessible at laser damage sites and more compact in adjacent regions [48]. It will be important to integrate these spatio-temporal changes in chromatin organization to refine our current model of DNA damage-induced chromatin plasticity.

6. Regulation of DNA damage-associated histone dynamics

Given the strong potential impact of DNA damage-induced histone dynamics on cellular functions, they should be tightly regu-

lated. Multiple parameters, summarized below, are likely to control the level of chromatin re-organization in response to DNA damage (Fig. 2).

First, efficient signaling and repair of DNA lesions may not require the same extent of chromatin reorganization depending on the type and location of DNA damage. Indeed, repair machineries would more easily detect DNA damage that highly distorts the DNA, while DNA lesions buried inside nucleosomes would require either opening or disruption of the chromatin core particle in order to be readily sensed. In addition, the extent of chromatin disorganization can vary a lot depending on the repair pathway at work to process the lesion. For example, DSB repair by HR involves extensive DNA end resection and is associated with loss of both inner and outer core histones at DSB sites, while only outer core histones are mobilized away from damaged regions when DSBs are repaired by Non-Homologous End Joining (NHEJ), which directly ligates the two broken ends [20]. Furthermore, it is tempting to speculate that chromatin reorganization during HR is not restricted to the damaged area, but could also affect the homologous template to favor strand invasion [21]. Extensive analyses of chromatin alterations in response to a variety of well-characterized genotoxic agents are necessary to determine the impact of DNA damage type on the extent of chromatin disorganization. Aside from the response to genotoxic stress, it will be important to better dissect chromatin plasticity associated with programmed DNA damage that occurs in meiosis or during the establishment of the immune repertoire in lymphocytes [49–51].

The cell cycle stage may also regulate DNA damage-induced histone dynamics. Indeed, not only does the cell cycle govern DNA repair pathway choice, in particular in the context of DSB repair, but it has also a profound impact on the abundance/availability of histone components and their associated factors. For example, it is conceivable that distinct chromatin alterations occur in rapidly cycling cells vs. post-replicative cells, in which the production of replicative histone variants is drastically reduced [10]. Moreover, is damaged chromatin similarly disorganized in mitotic cells, characterized by massive compaction when compared to interphase cells? Are there distinctive features of DNA damage-associated histone dynamics due to ongoing replication in S-phase cells? Synchronizing cells at specific stages in the cell cycle and considering also post-replicative cells will be required for appreciating to which extent cell cycle progression impacts on DNA damage-associated histone dynamics.

The initial chromatin organization/dynamics and transcriptional state are additional key factors influencing how DNA damage challenges chromatin organization. We will not extensively comment on these as they have already been the focus of recent reviews [52,53]. In particular, highly compact and poorly transcribed heterochromatin is generally viewed as a barrier to signaling and repair of DNA lesions, which is relieved in part by chromatin decondensation.

Chromatin dynamics are also substantially different depending on cell type, as illustrated by a higher chromatin mobility in cells that are not committed yet to differentiation [54], which might govern a specific chromatin response to DNA damage. Thus, it will be interesting to consider reshaping of damaged chromatin not only at the single cell level but also throughout the organism and during development.

7. Conclusions

Over the past decades, deciphering how both genome and epigenome integrity are preserved when challenged by DNA damage has been the focus of intense research. This contributed to build our current view of chromatin dynamics in response to genotoxic stress, where histone proteins are integral players of the DNA dam-

age response that coordinate efficient signaling and repair of DNA lesions with the maintenance of cell identity. However, despite considerable efforts, many key issues remain unaddressed, as summarized in this review. It will be particularly important to further explore the molecular bases of histone dynamics in damaged chromatin and their cross-talks with cellular functions to understand their impact on cell fate. This should shed light on the potentially deleterious consequences of altered chromatin dynamics, which are widely acknowledged as hallmarks of aging and cancer.

Acknowledgments

We are grateful to Wim Vermeulen for critical reading of the manuscript. Research in S.E.P. group is supported by the European Research Council (ERC starting grant ERC-2013-StG-336427 “Epln”), the French National Research Agency (ANR-12-JSV6-0002-01), the “Who am I?” laboratory of excellence (ANR-11-LABX-0071) funded by the French Government through its “Investments for the Future” program (ANR-11-IDEX-0005-01), EDF Radiobiology program RB 2014-01 and the Fondation ARC. S.A. is the recipient of a PhD fellowship from University Pierre et Marie Curie and La Ligue contre le Cancer. J.D. is the recipient of a PhD fellowship from University Paris Diderot.

References

- [1] S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature* 461 (2009) 1071–1078, <http://dx.doi.org/10.1038/nature08467>.
- [2] A. Ciccia, S.J. Elledge, The DNA damage response: making it safe to play with knives, *Mol. Cell* 40 (2010) 179–204, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>.
- [3] M. Papamichos-Chronakis, C.L. Peterson, Chromatin and the genome integrity network, *Nat. Rev. Genet.* 14 (2013) 62–75, <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3345>.
- [4] C.L. Peterson, G. Almouzni, Nucleosome dynamics as modular systems that integrate DNA damage and repair, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 5 (2013), <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a012658>.
- [5] B.D. Price, A.D. D’Andrea, Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks, *Cell* 152 (2013) 1344–1354, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.011>.
- [6] G. Smeenk, H. van Attikum, The chromatin response to DNA breaks: leaving a mark on genome integrity, *Ann. Rev. Biochem.* 82 (2013) 55–80, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-174504>.
- [7] M.J. Smerdon, DNA repair and the role of chromatin structure, *Curr. Opin. Cell Biol.* 3 (1991) 422–428.
- [8] C.M. Green, G. Almouzni, When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics, *EMBO Rep.* 3 (2002) 28–33, <http://dx.doi.org/10.1093/embo-reports/kv005>.
- [9] G. Soria, S.E. Polo, G. Almouzni, Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response, *Mol. Cell* 46 (2012) 722–734, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.002>.
- [10] I. Maze, K.-M. Noh, A.A. Soshnev, C.D. Allis, Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease, *Nat. Rev. Genet.* 15 (2014) 259–271, <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3673>.
- [11] P.B. Talbert, S. Henikoff, Environmental responses mediated by histone variants, *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 642–650, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2014.07.006>.
- [12] A.J. Bannister, T. Kouzarides, Regulation of chromatin by histone modifications, *Cell Res.* 31 (2011) 381–395, <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- [13] Z.A. Gurard-Levin, J.-P. Quivy, G. Almouzni, Histone chaperones: assisting histone traffic and nucleosome dynamics, *Ann. Rev. Biochem.* 83 (2014) 487–517, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035536>.
- [14] B. Bartholomew, Regulating the chromatin landscape: structural and mechanistic perspectives, *Ann. Rev. Biochem.* 83 (2013) 671–696, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-051810-093157>.
- [15] S.E. Polo, Reshaping chromatin after DNA damage: the choreography of histone proteins, *J. Mol. Biol.* 427 (2015) 626–636, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.05.025>.
- [16] H. Wang, L. Zhai, J. Xu, H.-Y. Joo, S. Jackson, H. Erdjument-Bromage, et al., Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage, *Mol. Cell* 22 (2006) 383–394, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.035>.
- [17] Y. Xu, Y. Sun, X. Jiang, M.K. Ayrappetov, P. Moskwa, S. Yang, et al., The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair, *J. Cell Biol.* 191 (2010) 31–43, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201001160>.

- [18] J. Kobayashi, H. Fujimoto, J. Sato, I. Hayashi, S. Burma, S. Matsuura, et al., Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway, *PLoS One* 7 (2011) e49245, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049245>.
- [19] E. Berkovich, R.J. Monnat, M.B. Kastan, Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 683–690, <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1599>.
- [20] M. Goldstein, F.A. Derheimer, J. Tait-Mulder, M.B. Kastan, Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 16874–16879, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1306160110>.
- [21] C. Courilleau, C. Chailleux, A. Jauneau, F. Grimal, S. Briois, E. Boutet-Robinet, et al., The chromatin remodeler p400 ATPase facilitates Rad51-mediated repair of DNA double-strand breaks, *J. Cell Biol.* 199 (2012) 1067–1081, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201205059>.
- [22] M.S. Luijsterburg, M. Lindh, K. Acs, M.G. Vrouwe, A. Pines, H. van Attikum, et al., DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage, *J. Cell Biol.* 197 (2012) 267–281, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201106074>.
- [23] T. Ikura, S. Tashiro, A. Kakino, H. Shima, N. Jacob, R. Amunugama, et al., DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics, *Mol. Cell Biol.* 27 (2007) 7028–7040, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.579-07>.
- [24] I. Nishibuchi, H. Suzuki, A. Kinomura, J. Sun, N.-A. Liu, Y. Horikoshi, et al., Reorganization of damaged chromatin by the exchange of histone variant H2A.Z-2, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 89 (2014) 736–744, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.03.031>.
- [25] T. Kusch, L. Florens, W.H. Macdonald, S.K. Swanson, R.L. Glaser, J.R. Yates, et al., Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions, *Science* 306 (2004) 2084–2087, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1103455>.
- [26] K. Heo, H. Kim, S.H. Choi, J. Choi, K. Kim, J. Gu, et al., FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16, *Mol. Cell* 30 (2008) 86–97, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.029>.
- [27] C. Dinant, G. Ampatzidis-Michailidis, H. Lans, M. Tresini, A. Lagarou, M. Grosbart, et al., Enhanced chromatin dynamics by FACT promotes transcriptional restart after UV-induced DNA damage, *Mol. Cell* 51 (2013) 469–479, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.007>.
- [28] Y. Xu, M.K. Ayrappetov, C. Xu, O. Gursoy-Yuzugullu, Y. Hu, B.D. Price, Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair, *Mol. Cell* 48 (2012) 723–733, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.026>.
- [29] G.-C. Taty-Taty, C. Courilleau, M. Quaranta, A. Carayon, C. Chailleux, F. Aymard, et al., H2A.Z depletion impairs proliferation and viability but not DNA double-strand breaks repair in human immortalized and tumoral cell lines, *Cell Cycle* 13 (2014) 399–407, <http://dx.doi.org/10.4161/cc.27143>.
- [30] C. Xu, Y. Xu, O. Gursoy-Yuzugullu, B.D. Price, The histone variant macroH2A.1 is recruited to DSBs through a mechanism involving PARP1, *FEBS Lett.* 586 (2012) 3920–3925, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.09.030>.
- [31] S. Khurana, M.J. Kruhlak, J. Kim, A.D. Tran, J. Liu, K. Nyswaner, et al., A macrohistone variant links dynamic chromatin compaction to BRCA1-dependent genome maintenance, *Cell Rep.* 8 (2014) 1049–1062, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.024>.
- [32] G. Timinszky, S. Till, P.O. Hassa, M. Hothorn, G. Kustatscher, B. Nijmeijer, et al., A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 923–929, <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1664>.
- [33] P.V. Mehrotra, D. Ahel, D.P. Ryan, R. Weston, N. Wiechens, R. Kraehenbuehl, et al., DNA repair factor APLF is a histone chaperone, *Mol. Cell* 41 (2011) 46–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.008>.
- [34] V. Sansoni, C.S. Casas-Delucchi, M. Rajan, A. Schmidt, C. Bönisch, A.W. Thomae, et al., The histone variant H2A Bbd is enriched at sites of DNA synthesis, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 6405–6420, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku303>.
- [35] X. Yang, L. Li, J. Liang, L. Shi, J. Yang, X. Yi, et al., Histone acetyltransferase 1 promotes homologous recombination in DNA repair by facilitating histone turnover, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 18271–18282, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.473199>.
- [36] S.G. Zeitlin, N.M. Baker, B.R. Chapados, E. Soutoglou, J.Y.J. Wang, M.W. Berns, et al., Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 15762–15767, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0908233106>.
- [37] A. Helfricht, W.W. Wiegant, P.E. Thijssen, A.C. Vertegaal, M.S. Luijsterburg, H. van Attikum, Remodeling and spacing factor 1 (RSF1) deposits centromere proteins at DNA double-strand breaks to promote non-homologous end-joining, *Cell Cycle* 12 (2013) 3070–3082, <http://dx.doi.org/10.4161/cc.26033>.
- [38] V. Mathew, A.-L. Pauleau, N. Steffen, A. Bergner, P.B. Becker, S. Erhardt, The histone-fold protein CHRAC14 influences chromatin composition in response to DNA damage, *Cell Rep.* 7 (2014) 321–330, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.008>.
- [39] S.E. Polo, D. Roche, G. Almouzni, New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells, *Cell* 127 (2006) 481–493, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.049>.
- [40] D. Latreille, L. Bluy, M. Benkirane, R.E. Kiernan, Identification of histone 3 variant 2 interacting factors, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 3542–3550, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1355>.
- [41] D.L. Bodor, M.G. Rodríguez, N. Moreno, L.E.T. Jansen, Analysis of protein turnover by quantitative SNAP-based pulse-chase imaging, *Curr. Protoc. Cell Biol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1002/0471143030.cb080855> (Chapter 8, unit 8.8).
- [42] S. Adam, S.E. Polo, G. Almouzni, Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA, *Cell* 155 (2013) 94–106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.029>.
- [43] B.T.K. Yuen, P.S. Knoepfler, Histone H3.3 mutations: a variant path to cancer, *Cancer Cell* 24 (2013) 567–574, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.015>.
- [44] A. Frey, T. Listovsky, G. Guilbaud, P. Sarkies, J.E. Sale, Histone H3.3 is required to maintain replication fork progression after UV damage, *Curr. Biol.* 24 (2014) 2195–2201, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.077>.
- [45] C. Alabert, J.-C. Bukowski-Wills, S.-B. Lee, G. Kustatscher, K. Nakamura, F. de Lima Alves, et al., Nascent chromatin capture proteomics determines chromatin dynamics during DNA replication and identifies unknown fork components, *Nat. Cell Biol.* 16 (2014) 281–293, <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2918>.
- [46] R.C. Burgess, B. Burman, M.J. Kruhlak, T. Misteli, Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin, *Cell Rep.* 9 (2014) 1703–1717, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.060>.
- [47] M.K. Ayrappetov, O. Gursoy-Yuzugullu, C. Xu, Y. Xu, B.D. Price, DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 9169–9174, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1403565111>.
- [48] E. Hinde, X. Kong, K. Yokomori, E. Gratton, Chromatin dynamics during DNA repair revealed by pair correlation analysis of molecular flow in the nucleus, *Biophys. J.* 107 (2014) 55–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.027>.
- [49] E. Brachet, V. Sommermeyer, V. Borde, Interplay between modifications of chromatin and meiotic recombination hotspots, *Biol. Cell/Under Auspices Eur. Cell Biol. Org.* 104 (2012) 51–69, <http://dx.doi.org/10.1111/boc.201100113>.
- [50] M. Aida, T. Honjo, FACT and H3.3: new markers for the somatic hypermutation, *Cell Cycle* 12 (2013) 2923–2924, <http://dx.doi.org/10.4161/cc.26178>.
- [51] S. Bevington, J. Boyes, Transcription-coupled eviction of histones H2A/H2B governs V(D)J recombination, *EMBO J.* 32 (2013) 1381–1392, <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2013.42>.
- [52] S. Adam, S.E. Polo, Blurring the line between the DNA damage response and transcription: the importance of chromatin dynamics, *Exp. Cell Res.* 329 (2014) 148–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.017>.
- [53] C. Lemaître, E. Soutoglou, Double strand break (DSB) repair in heterochromatin and heterochromatin proteins in DSB repair, *DNA Repair (Amst.)* 19 (2014) 163–168, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.015>.
- [54] A. Burton, M.-E. Torres-Padilla, Chromatin dynamics in the regulation of cell fate allocation during early embryogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 723–735, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3885>.
- [55] E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, W.M. Bonner, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5858–5868.
- [56] D.V. Oliveira, A. Kato, K. Nakamura, T. Ikura, M. Okada, J. Kobayashi, et al., Histone chaperone FACT regulates homologous recombination by chromatin remodeling through interaction with RNF20, *J. Cell Sci.* 127 (2014) 763–772, <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.135855>.
- [57] R. Murr, J.I. Loizou, Y.-G. Yang, C. Cuenin, H. Li, Z.-Q. Wang, et al., Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 91–99, <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1343>.

Annexe 5 : Suivre la dynamique d'histones néo-synthétisées dans la chromatine lésée aux UVC

Imaging local deposition of newly synthesized histones in UVC-damaged chromatin.

Visualiser l'incorporation locale de nouvelles histones dans la chromatine endommagée aux UVC.

Salomé Adam*, Juliette Dabin*, Siau-Kun Bai, Sophie E. Polo

Methods Mol. Biol., 2015 : 337-347, 2015

* Contribution équivalente

Dans cet article de méthodologie, nous exposons le protocole expérimental que nous avons élaboré au laboratoire afin de suivre la mise en place de variants de l'histone H3 néo-synthétisés aux sites de dommages UVC dans des lignées cellulaires humaines. Ce protocole décrit à la fois :

- (1) Comment nous avons marqué spécifiquement les nouvelles histones en mettant à profit la technologie SNAP.
- (2) Comment nous avons induit des dommages locaux de l'ADN, en irradiant les cellules avec une lampe UVC à travers de filtres percés de micropores.

Chapter 19

Imaging Local Deposition of Newly Synthesized Histones in UVC-Damaged Chromatin

Salomé Adam*, Juliette Dabin*, Siau-Kun Bai, and Sophie E. Polo

Abstract

DNA damage not only jeopardizes genome integrity but also challenges the well-organized association of DNA with histone proteins into chromatin, which is key for regulating gene expression and cell functions. The extent to which the original chromatin structure is altered after repair of DNA lesions is thus a critical issue. Dissecting histone dynamics at sites of DNA damage has provided mechanistic insights into chromatin plasticity in response to genotoxic stress. Here, we present an experimental protocol for visualizing the deposition of newly synthesized histone H3 variants at sites of UVC damage in human cells that couples SNAP-tag based labeling of new histones with local UVC irradiation of cells through micropore filters.

Key words Local UVC damage, Histone H3 variants, Chromatin assembly, SNAP technology, Fluorescence microscopy

1 Introduction

In eukaryotic cells, the DNA damage response takes place on a chromatin substrate, where DNA is associated with histone proteins [1]. These proteins, through their posttranslational modifications [2] and the existence of sequence variants [3], contribute to encoding epigenetic information, which modulates gene expression without changes to the DNA sequence. The inheritance of epigenetic marks through cell generations is key for maintaining cell function and identity. Understanding how the epigenetic information is preserved after a genotoxic assault is thus a matter of intense investigation. The current model, known as “Access/Prime-Repair-Restore” [4, 5], postulates that chromatin organization is first destabilized after DNA damage induction to allow repair machineries to have access to the damage and repair the DNA. Chromatin structure is subsequently restored, and the latter step involves histone deposition onto DNA by specific proteins called histone chaperones [6, 7].

* equal contribution

The first evidence of chromatin reorganization upon genotoxic stress came from monitoring the accessibility to nuclease digestion of purified chromatin from UVC-irradiated human fibroblasts [8, 9]. These pioneering experiments revealed a transient disassembly of chromatin regions undergoing repair. Chromatin reassembly coupled to DNA repair was further studied *in vitro* on DNA templates damaged by UVC irradiation or nuclease digestion, by analyzing the supercoiling of damaged plasmids or the association of histone proteins with damaged DNA immobilized onto magnetic beads (methods described in ref. [10, 11]). More recently, the *in vivo* analysis of histone dynamics in response to DNA damage has been facilitated by the development of multiple methods for inflicting localized DNA damage in living cells [12, 13]. Among them, localized UVC irradiation through micropore filters [14, 15] is one of the easiest to implement. Furthermore, this method generates predominantly pyrimidine dimers, which are repaired by the well-characterized and evolutionarily conserved NER pathway (Nucleotide Excision Repair) [16]. NER is an attractive model system that already provided significant insights into chromatin alterations and histone dynamics in response to DNA damage (reviewed in ref. [11]).

One important advance in our understanding of chromatin reassembly after DNA damage has been the realization that restoration of damaged chromatin structure involves new histone incorporation [17, 18]. Given that posttranslational modifications on new soluble histones are distinct from parental histone marks [19], the replacement of parental histones by new histones is likely to dilute the original information in damaged chromatin regions, thus challenging the maintenance of epigenetic information. The recent development of *in vivo* methods that discriminate between parental and newly synthesized histones was instrumental for investigating such plasticity of chromatin in response to DNA damage. The first method to be developed is based on analyzing cells short term after transient transfection of Flag-HA-tagged H3.1 histone variant [17]. H3.1 belongs to the family of replicative histone variants, which are expressed at highest levels during S-phase, as opposed to replacement variants. H3.1 was chosen for this assay because its deposition into chromatin is coupled to DNA synthesis and restricted to S-phase cells in the absence of DNA damage, thus facilitating the visualization of *de novo* incorporation events at sites of UVC irradiation outside S-phase. However, quantitative analysis of new histone deposition is hampered in this case by the heterogeneity of tagged-H3.1 expression inherent to transient transfection. In addition, this method is poorly suited for dissecting the dynamics of replacement histone variants whose global incorporation into chromatin in a replication-independent manner obscures their local mobilization at sites of DNA damage. For example, it is the case of the H3.3 replacement variant, which is deposited into chromatin all along the cell cycle and in non-cycling cells [20].

Here, we describe a recently implemented method that circumvents these caveats and allows specific tracking of newly synthesized histone H3 variants at damage sites. This method combines local UVC irradiation through micropore filters with SNAP-tag based imaging of newly synthesized H3 variants in human cells stably expressing SNAP-tagged histones [18]. SNAP-tag based labeling of histone proteins was pioneered by studies on the centromeric H3 variant CENPA in human cells [21, 22] and proved to be a powerful technique for visualizing the de novo deposition of several H3 variants in vivo [18, 23–25].

2 Materials

2.1 Cell Culture

1. Human U2OS cells stably expressing H3.1- or H3.3-SNAP [23] (*see Note 1*).
2. Culture medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose, GlutaMAX, sodium pyruvate and phenol red (DMEM, Gibco) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Eurobio), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco), and 100 µg/ml G418 disulfate salt solution (Sigma). Store at 4 °C.
3. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without calcium, magnesium, phenol red (DPBS 1×, Gibco).
4. Sterile round glass coverslips 12 mm diameter, thickness No. 1 (Marienfeld).
5. 4-well cell culture plates (1.9 cm²/well, NUNC).

2.2 SNAP Reagents

1. Quenching SNAP substrate: Prepare 4 mM stock solution by dissolving 100 nmol SNAP-Cell® Block (New England Biolabs) into 25 µl sterile dimethyl sulfoxide solution (DMSO, Sigma). Store at –20 °C.
2. Fluorescent SNAP substrate: Prepare 200 µM stock solution by dissolving 30 nmol SNAP-Cell® TMR-STAR (New England Biolabs) into 150 µl sterile dimethyl sulfoxide solution (DMSO, Sigma). Store 30 µl aliquots at –20 °C (*see Note 2*).

2.3 Local UVC Irradiation

1. UVC lamp 254 nm, 6 W on lamp stand (Vilber Lourmat).
2. VLX-3W dosimeter equipped with a 254 nm sensor (Vilber Lourmat).
3. Isopore membrane filters 5 µm pore size, 13 mm diameter (Millipore).
4. 6-cm diameter cell culture dish (TPP).
5. Face shield or protective glasses (Vilber Lourmat).
6. Acrylic benchtop radiation shield (Nalgene).

2.4 Immunofluorescence

1. 1× Phosphate Buffer Saline (PBS, Gibco).
2. CytoSKeleton (CSK) buffer: 10 mM PIPES pH 7.0, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂. Store at -20 °C.
3. CSK-Tx: 0.5 % Triton X-100 (Euromedex) in CSK buffer, freshly made.
4. 16 % Paraformaldehyde solution EM grade (PAF, Electron Microscopy Sciences). Freshly prepare 2 % PAF by diluting in 1× PBS.
5. PBS-T: 0.1 % Tween 20 (Sigma) diluted in 1× PBS. Keep at room temperature.
6. Blocking buffer: 5 % Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma) dissolved in PBS-T, freshly made.
7. Sodium azide solution: Sodium azide (Sigma-Aldrich) 2 % w/v in H₂O. Store at 4 °C.
8. Primary antibody mouse monoclonal anti-human XPA (clone 12F5, BD Biosciences), 0.5 mg/ml stock solution.
9. Secondary antibody Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG highly cross-adsorbed (Molecular Probes), 2 mg/ml stock solution.
10. VECTASHIELD mounting medium with DAPI (Vector Laboratories).
11. Superfrost microscope slides (Menzel-Gläser).
12. Leica epifluorescence microscope with 63× Apochromat N.A. 1.4 oil-immersion objective.

3 Methods

Here, we describe a protocol for monitoring the dynamics of newly synthesized histone H3 variants at sites of DNA damage in human cells. This method combines SNAP-tag-based imaging [22] with local UVC irradiation of cells through micropore filters [10, 14, 15]. The SNAP-tag is a modified version of the human suicide-enzyme AGT that catalyzes its own irreversible binding to benzylguanine derivatives [26, 27]. Such SNAP substrates exist in a cell-permeable form, suitable for labeling intracellular proteins including histones. Here, newly synthesized SNAP-tagged histones are specifically labeled with a red-fluorescent SNAP substrate (step 1) by first quenching all preexisting SNAP-tagged histones with a nonfluorescent SNAP substrate [18, 21, 22, 24]. Local UVC irradiation (step 2) induces damage in discrete regions that are randomly distributed in the cells. Immunodetection of the repair factor XPA (steps 3 and 4) is thus used to visualize the sites of DNA damage.

The whole protocol can be completed in 1 day (*see* Fig. 1, **Note 3**).

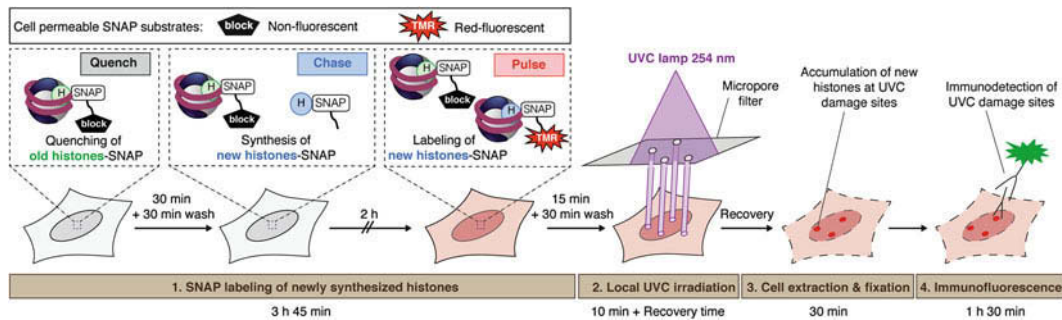


Fig. 1 Scheme of the assay for monitoring new histone dynamics upon local UVC irradiation in human cell lines stably expressing SNAP-tagged histones. By quenching preexisting SNAP-tagged histones with a nonfluorescent substrate (block), only histones neo-synthesized during the chase period are labeled with the red fluorescent substrate TMR-star (TMR) during the pulse step. Local UVC damage is induced by irradiating cells with a UVC lamp through micropore filters and UVC damaged regions are marked by immunofluorescence

3.1 SNAP Labeling of Newly Synthesized Histones (See Note 4)

1. Grow cells on glass coverslips in 4-well plates with 0.5 ml culture medium per well (*see Note 5*). Incubate in a humidified 37 °C incubator with 5 % CO₂ until cells reach 70 % confluency.
2. Dilute the quenching SNAP substrate in culture medium to a final concentration of 10 μM. Quench preexisting SNAP-tagged histones by incubating cells with 200 μl of this solution per well for 30 min at 37 °C, 5 % CO₂.
3. Wash out the excess of quenching substrate by rinsing cells twice with 1 ml PBS and incubate cells in 1 ml culture medium per well for 30 min at 37 °C, 5 % CO₂.
4. Chase time: Rinse cells twice with 1 ml PBS and incubate cells in 1 ml culture medium per well for 2 h at 37 °C, 5 % CO₂ (*see Note 6*).
5. Dilute the fluorescent SNAP substrate in culture medium to a final concentration of 2 μM (*see Notes 7 and 8*). Pulse-label newly synthesized SNAP-tagged histones by incubating cells with 200 μl of this solution per well for 15 min at 37 °C, 5 % CO₂.
6. Wash out the excess of fluorescent substrate by rinsing cells twice with 1 ml PBS and incubate cells in 1 ml culture medium per well for 30 min at 37 °C, 5 % CO₂ (*see Note 9*).
7. Rinse cells twice with 1 ml PBS and re-incubate in 1 ml culture medium per well.

3.2 Local UVC Irradiation (See Note 10)

1. Set up the UVC lamp behind an acrylic benchtop radiation shield (*see Note 11*).
2. Warm up the UVC lamp for 1–2 min until the power stabilizes. Determine two positions on the lamp stand receiving identical fluence rates as monitored with the dosimeter, so that the cells are irradiated at one position and the UV fluence rate can be monitored simultaneously at the other position (*see Note 12*).
3. Drain and transfer one coverslip (cells up) to the center of a 6-cm diameter culture dish. Cover the coverslip with a micropore filter (*see Note 13*). Close the lid of the culture dish.
4. To irradiate the cells, place the closed dish at the determined position on the lamp stand and remove the lid of the culture dish.
5. When a UV dose of 150 J/m² is reached (0.0150 J/cm² read on the dosimeter), stop irradiation by placing the lid back on the culture dish (*see Note 14*).
6. Remove the micropore filter from the coverslip by pouring PBS into the culture dish (*see Note 15*). Transfer the irradiated coverslip (cells up) back into the 4-well plate containing culture medium.
7. Incubate cells for at least 30 min at 37 °C, 5 % CO₂ (*see Note 16*).

3.3 Cell Extraction and Fixation

All steps are performed at room temperature and volumes are given per well of a 4-well plate.

1. 45 min after irradiation (*see Note 17*), rinse cells on coverslips once with 500 µl PBS and once with 500 µl CSK.
2. To remove soluble cell components, incubate for 5 min with 500 µl CSK-Tx (*see Note 18*).
3. Stop extraction by rinsing cells once with 500 µl CSK and once with 500 µl PBS (*see Note 19*, also **Note 15**).
4. Fix cells with 500 µl PAF solution for 20 min.
5. Rinse three times with 500 µl PBS (*see Note 20*).

3.4 Immunofluorescence (See Note 21)

All steps are performed at room temperature and volumes are given per well of a 4-well plate unless stated otherwise.

1. Block aspecific sites by incubating cells on coverslips with 500 µl BSA blocking buffer for 10 min.
2. Transfer coverslips (cells up) to Parafilm and cover each coverslip with 50 µl anti-XPA primary antibody (*see Note 22*) diluted 1:500 in blocking buffer containing 2 % sodium azide (*see also Note 23*). Incubate for 45 min.
3. Transfer coverslips (cells up) back into the 4-well plate and rinse three times with 500 µl PBS-T.

4. Retrieve the primary antibody solution and keep it at 4 °C for reuse (*see Note 23*).
5. Incubate cells for 30 min at room temperature with 250 µl of Alexa Fluor 488 anti-mouse secondary antibody diluted 1:1,000 in blocking buffer.
6. Rinse cells twice with 500 µl PBS-T and once with 500 µl PBS.
7. Mount coverslips (cells down) on Superfrost slides with 10 µl mounting medium with DAPI per coverslip. Seal coverslips with clear nail polish.
8. Store at 4 °C for at least 15 min before microscope observation (*see Note 24*).
9. Images are acquired using a Leica epifluorescence microscope with 63× Apochromat N.A. 1.4 oil-immersion objective. The Y3 filter is used for visualizing TMR star fluorescence (*see Fig. 2*).

4 Notes

1. This protocol is optimized for U2OS cells stably expressing SNAP-tagged H3 variants, but it can be adapted to other cell types, stably or transiently expressing SNAP-tagged histones. Stable monoclonal cell lines are preferred to ensure minimal cell-to-cell variability in transgene expression.
2. The fluorescent SNAP substrate must be protected from light and is sensitive to repeated freeze–thaw cycles. It is thus advisable to prepare aliquots of the stock solution.
3. For a deeper understanding of the mechanisms underlying histone dynamics at UV sites, this protocol can be combined with siRNA-mediated depletion of histone chaperones and NER factors or with inhibition of enzymatic activities involved in the UV damage response [18].
4. The SNAP labeling of newly synthesized histones is usually done under sterile conditions, but it is not absolutely required as cells are fixed a few hours later.
5. We generally work in 4-well plates with 12-mm diameter coverslips in order to minimize the amount of reagents used, but the method can be scaled-up to process larger coverslips in 6-well plates.
6. The chase time can be adapted depending on the expression level of SNAP-tagged histones and on the turnover of histone proteins. You can also verify quenching efficiency by performing the pulse immediately after the quench step, omitting both wash and chase procedures.

344 S. Iomé Am et al.

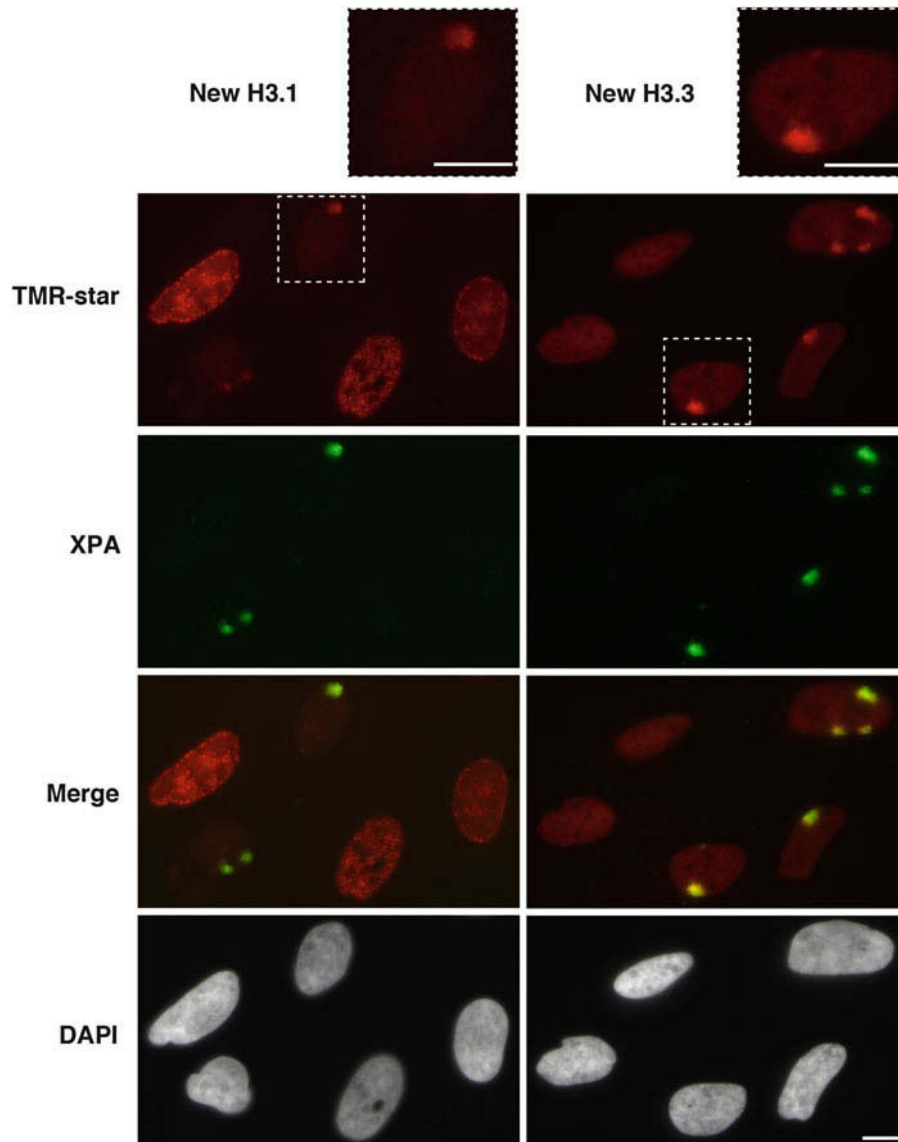


Fig. 2 New H3.1 and H3.3 deposition at UVC damage sites. Newly synthesized SNAP-tagged H3.1 and H3.3 histone variants labeled with TMR-star accumulate at UVC damage sites marked by the repair factor XPA. Cells are fixed 45 min after local UVC irradiation. The focal patterns observed with new H3.1 in undamaged nuclei correspond to replication-coupled deposition. Cell nuclei are co-stained with DAPI. Scale bars, 10 μm

7. Centrifuge the fluorescent SNAP substrate before pipetting to avoid aggregates.
8. The red-fluorescent substrate SNAP-Cell[®] TMR-star can be replaced by the green-fluorescent SNAP-Cell[®] Oregon-Green[®] at a final concentration of 5 μM . In this case, the secondary antibody used for immunofluorescence should be labeled with Alexa Fluor 594 or 568.

9. The washing procedures are critical to minimize background signal. The specificity of SNAP labeling can be controlled on the parent U2OS cell line, which does not express SNAP-tagged proteins and thus should not be stained.
10. Local UVC irradiation can be performed either after completing the SNAP labeling procedure as described in this protocol or immediately before the pulse step with similar results. We did not observe bleaching of TMR star fluorescence by UVC light.
11. Wear protective gloves, glasses and lab coat when performing UVC irradiation.
12. In our irradiation settings, the average exposure time to UVC is 30 s with a fluence rate stabilizing around 0.5 mW/cm² for a lamp-to-specimen distance of 13 cm. However, the fluence rate varies with time and between UVC lamps, so it is necessary to monitor systematically the UV fluence with a dosimeter.
13. Around 98 % of UVC light is stopped by the micropore filter.
14. The UVC dose can be varied from 50 to 500 J/m² to assess the dose-dependency of the observed response.
15. Cells normally do not detach from the coverslip but if this happens it can be prevented by coating the coverslips with poly-L-lysine or collagen-fibronectin before seeding the cells.
16. The local accumulation of fluorescently labeled SNAP-tagged H3 variants at damage sites can also be visualized at this stage in live cells.
17. You can vary the recovery time between UVC irradiation and cell fixation to analyze the kinetics of new histone deposition at UVC damage sites.
18. Triton extraction before fixation removes soluble proteins and thus allows specific visualization of chromatin-bound histones. If one wants to assess the production of SNAP-tagged histones rather than their incorporation into chromatin, the cells can be fixed directly after the SNAP labeling procedure without Triton pre-extraction. This control is particularly important if you observe a defect in chromatin-bound histones at damage sites, to determine if it results from defective histone protein synthesis or deposition.
19. Wash gently as cells can detach from coverslips during the extraction procedure. The extraction conditions can be adjusted (duration, temperature) depending on cell type.
20. Fixed cells can be kept at 4 °C in PBS for up to 1 week before performing immunofluorescence.

21. As the fluorescent SNAP substrate is light sensitive, it is advisable to protect cells from light all along the immunofluorescence protocol.
22. Instead of detecting XPA, we have also successfully visualized UVC-damaged regions by immunofluorescence against the NER factor XPB using anti-XPB primary antibody (rabbit polyclonal anti-TFIIH p89, Santa Cruz Biotechnology, 1:400 dilution) and Alexa Fluor 488 anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes). Note that at late time points after UVC irradiation (over 2 h), NER factors become barely detectable at UV sites. In this case, UVC damage should be labeled directly using for example an antibody against the most abundant and slowly repaired UVC lesions Cyclobutane Pyrimidine Dimers (mouse monoclonal anti-CPD, clone KTM53, Kamiya Biomedical Company, 1:1,000 dilution). Importantly, CPD immunodetection requires 5 min denaturation with 0.5 M NaOH and neutralization by three washes in PBS before blocking.
23. Sodium azide allows proper conservation of primary antibody solutions by preventing microbial contamination. The antibody dilutions can thus be kept for several months at 4 °C and can be reused multiple times.
24. The slides can be kept at 4 °C in the dark for up to 1 week before image acquisition or at -20 °C for longer storage.

Acknowledgements

We thank Dominique Ray-Gallet for critical reading of the manuscript. Research in S.E.P. group is supported by the European Research Council (ERC starting grant ERC-2013-StG-336427 “EpIn”), the French National Research Agency (ANR-12-JSV6-0002-01), the “Who am I?” laboratory of excellence (ANR-11-LABX-0071) funded by the French Government through its “Investments for the Future” program (ANR-11-IDEX-0005-01), EDF Radiobiology program RB 2014-01 and the Foundation ARC. S.A. is recipient of a PhD fellowship from University Pierre and Marie Curie and La Ligue contre le Cancer.

References

1. Kornberg RD (1977) Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 46:931–954
2. Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21:381–395
3. Talbert PB, Henikoff S (2010) Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:264–275
4. Smerdon MJ (1991) DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr Opin Cell Biol* 3:422–428
5. Soria G, Polo SE, Almouzni G (2012) Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol Cell* 46:722–734
6. De Koning L, Corpet A, Haber JE et al (2007) Histone chaperones: an escort network

- regulating histone traffic. *Nat Struct Mol Biol* 14:997–1007
7. Burgess RJ, Zhang Z (2013) Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat Struct Mol Biol* 20:14–22
 8. Smerdon MJ, Lieberman MW (1978) Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA-repair synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 75:4238–4241
 9. Smerdon MJ, Lieberman MW (1980) Distribution within chromatin of deoxyribonucleic acid repair synthesis occurring at different times after ultraviolet radiation. *Biochemistry* 19:2992–3000
 10. Gérard A, Polo SE, Roche D et al (2006) Methods for studying chromatin assembly coupled to DNA repair. *Methods Enzymol* 409:358–374
 11. Adam S, Polo SE (2012) Chromatin dynamics during nucleotide excision repair: histones on the move. *Int J Mol Sci* 13:11895–11911
 12. Dinant C, de Jager M, Essers J et al (2007) Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods. *J Cell Sci* 120:2731–2740
 13. Polo SE, Jackson SP (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* 25:409–433
 14. Moné MJ, Volker M, Nikaido O et al (2001) Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Rep* 2:1013–1017
 15. Katsumi S, Kobayashi N, Imoto K et al (2001) In situ visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 117:1156–1161
 16. Nospikel T (2009) DNA repair in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 66:994–1009
 17. Polo SE, Roche D, Almouzni G (2006) New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* 127:481–493
 18. Adam S, Polo SE, Almouzni G (2013) Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA. *Cell* 155:94–106
 19. Loyola A, Bonaldi T, Roche D et al (2006) PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol Cell* 24:309–316
 20. Szenker E, Ray-Gallet D, Almouzni G (2011) The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res* 21:421–434
 21. Jansen LET, Black BE, Foltz DR et al (2007) Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J Cell Biol* 176:795–805
 22. Bodor D, Rodríguez M, Moreno N (2012) Analysis of protein turnover by quantitative SNAP-based pulse-chase imaging. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 8, Unit 8.8.
 23. Dunleavy EM, Almouzni G, Karpen GH (2011) H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G₁ phase. *Nucleus* 2:146–157
 24. Ray-Gallet D, Woolfe A, Vassias I et al (2011) Dynamics of histone H3 deposition in vivo reveal a nucleosome gap-filling mechanism for h3.3 to maintain chromatin integrity. *Mol Cell* 44:928–941
 25. Corpet A, Olbrich T, Gwerder M et al (2014) Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization. *Cell Cycle* 13:249–267
 26. Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T et al (2003) A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol* 21:86–89
 27. Keppler A, Pick H, Arrivoli C et al (2004) Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci* 101:9955–9959

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Qu'est-ce que l'épigénétique: une interprétation par la cellule de sa partition génétique	10
Figure 2 : Nature et conséquences moléculaires des principaux dommages à l'ADN	13
Figure 3 : Les dimères de pyrimidines, dommages à l'ADN majoritairement induits par les UVC	15
Figure 4 : Réparation par Excision de Nucléotides des lésions de l'ADN générées par les UVC chez l'homme	16
Figure 5 : Schéma des complexes protéiques impliqués dans la détection des lésions de l'ADN induites par les UVC chez l'homme	18
Figure 6 : Hypothèses décrivant le devenir potentiel de l'ARNPII bloquée au site de dommage	23
Figure 7 : Principaux faits marquants de l'historique de la chromatine	25
Figure 8 : Illustration de la structure répétée de la chromatine avec son unité de base, le nucléosome	26
Figure 9 : Structure cristallographique de la particule cœur du nucléosome.....	27
Figure 10 : Illustration des différents niveaux de compaction de la chromatine.....	28
Figure 11 : Représentation schématique des quatre familles principales de facteurs de remodelage de la chromatine	31
Figure 12 : Quelques exemples de modifications post-traductionnelles des histones présentes dans les cellules humaines	32
Figure 13 : Principales caractéristiques structurales de H3.3 chez l'homme	37
Figure 14 : Modèle de distribution des variants de l'histone H3 dans le génome des mammifères assurée grâce à l'action de chaperons d'histone spécifiques	40
Figure 15 : Conservation du complexe chaperon HIRA entre organismes	42
Figure 16 : Principales mutations ponctuelles de H3.3 associées à des cancers humains	50
Figure 17 : Modèle « Accessibilité-Réparation-Restitution »	54
Figure 18 : Modèle illustrant la dynamique des histones couplée aux étapes précoces de la réparation NER	60
Figure 19 : Modèle illustrant la dynamique des histones couplée aux étapes tardives de la réparation NER	64
Figure 20 : Modèle illustrant la plasticité de la chromatine associée à la baisse d'expression des gènes endommagés	67
Figure 21 : Modèle illustrant l'impact de la dynamique de la chromatine sur la reprise de la transcription post irradiation aux UVC.....	70
Figure 22 : Analyse de la dynamique des histones H3 après irradiation locale aux UVC par la technologie SNAP.....	74
Figure 23 : Modèle de la dynamique des histones parentales et néo-synthétisées après irradiation locale aux UVC : questions soulevées au cours de ma thèse	76
Figure 24 : Couplage entre les fonctions cellulaires et la dynamique des histones dans la chromatine endommagée	161

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales maladies associées à des défauts de réparation ou de tolérance aux dommages générés par les UV	21
Tableau 2 : Quelques exemples de composants non-histones participant à l'architecture de la chromatine dans les cellules de mammifères	29
Tableau 3 : Enzymes et domaines de reconnaissance associés aux principales marques post-traductionnelles des histones.....	33
Tableau 4 : Liste des principaux variants d'histones chez les mammifères	36
Tableau 5 : Rôle de H3.3 et de ses chaperons associés chez divers organismes.....	48
Tableau 6 : Principales marques post-traductionnelles des histones induites par les UVC ...	58

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles scientifiques :

Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA.

Le processus de reprise de la transcription après dommages de l'ADN nécessite un système de marquage de la chromatine dépendant du chaperon HIRA, chaperon d'histone dédié à H3.3.

Salomé Adam, Sophie E. Polo, Geneviève Almouzni

Cell, 155 : 94-106, 2013

Epigenome stability after DNA damage through conservative redistribution of parental histones coupled to repair.

Maintien de l'intégrité de l'épigénome après dommages de l'ADN grâce à une redistribution conservatrice des histones parentales couplée à la réparation de l'ADN.

Salomé Adam*, Juliette Dabin*, Odile Chevallier, Olivier Leroy, Olivier Renaud, Geneviève Almouzni, Sophie E. Polo

Manuscrit en préparation

* Contribution équivalente

Revue & articles de méthodologie :

Chromatin dynamics during nucleotide excision repair : Histones on the move.

La dynamique de la chromatine associée à la réparation de l'ADN par excision de nucléotides : les histones en mouvement (**Annexe 3**).

Salomé Adam, Sophie E. Polo

Int. J. Mol. Sci., 13 : 11895-11911, 2012

How to restore chromatin structure and function in response to DNA damage : let the chaperone play.

Comment est restituée l'organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN : laissez jouer les chaperons d'histones (**Annexe 2**).

Salomé Adam, Sophie E. Polo, Geneviève Almouzni

FEBS J., 281 : 2315-2323, 2014

Blurring the line between the DNA damage response and transcription : the importance of chromatin dynamics.

Effacer les limites entre les voies de réponse aux dommages de l'ADN et la transcription : l'importance de la dynamique de la chromatine (**Annexe 1**).

Salomé Adam, Sophie E. Polo

Exp. Cell. Res., 329 : 148-153, 2014

Imaging local deposition of newly synthesized histones in UVC-damaged chromatin.

Visualiser l'incorporation locale de nouvelles histones dans la chromatine endommagée aux UVC (**Annexe 5**).

Salomé Adam*, Juliette Dabin*, Siau-Kun Bai, Sophie E. Polo

Methods Mol. Biol., 2015 : 337-347, 2015

* Contribution équivalente

Chromatin plasticity in response to DNA damage : the shape of things to come.

La plasticité de la chromatine en réponse aux dommages de l'ADN : les futurs défis à relever (**Annexe 4**).

Salomé Adam*, Juliette Dabin*, Sophie E. Polo

DNA Repair, 2015, *sous presse*

* Contribution équivalente

Résumé :

Dans les cellules eucaryotes, la réponse aux dommages de l'ADN s'accompagne d'une réorganisation de la chromatine. Cette structure, associant l'ADN aux protéines histones, est porteuse de l'information épigénétique, qui définit l'identité cellulaire. Cependant, nos connaissances concernant les mécanismes impliqués dans la réorganisation de la chromatine dont l'intégrité structurale et fonctionnelle a été menacée par un stress génotoxique sont encore limitées, en particulier dans les cellules humaines. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à cette thématique en me concentrant sur l'étude de la dynamique des variants de l'histone H3 et de leurs chaperons associés après dommages UVC. Mes principaux objectifs étaient de développer un système expérimental permettant de visualiser la dynamique des variants de H3 aux sites de dommages de l'ADN, d'en déterminer les mécanismes et de comprendre comment cette dynamique participe à la restitution de la structure et de l'activité transcriptionnelle de la chromatine après stress génotoxique. En combinant une technologie innovante de suivi spécifique des histones parentales ou néo-synthétisées à des techniques de pointe d'induction de dommages locaux dans l'ADN, j'ai ainsi mis en évidence que le chaperon HIRA (Histone Regulator A) est recruté tôt aux sites de lésions où il stimule l'incorporation locale de nouveaux variants H3.3 et assure la reprise de la transcription après réparation des dommages UVC. Nous avons aussi démontré que les anciennes histones H3 sont initialement redistribuées autour des sites de lésions de l'ADN par un mécanisme faisant appel au facteur de détection des dommages DDB2 (DNA Damage Binding protein 2). A plus long terme, des histones parentales « reviennent » dans les régions de chromatine en cours de réparation où elles se mélangent aux nouvelles histones incorporées. Le « retour » d'histones préexistantes contribuerait ainsi au maintien de l'intégrité de l'information épigénétique véhiculée par la chromatine avant stress génotoxique.

Mots clés : assemblage de la chromatine ; variants d'histones ; chaperons d'histones ; dommages UVC ; régulation de la transcription ; intégrité de l'information épigénétique

Histone H3 variant dynamics in response to UVC damage in human cells

Abstract :

In eukaryotic cells, the DNA damage response involves a reorganization of chromatin structure. This structure, in which DNA is associated with histone proteins, conveys the epigenetic information, which is critical for cell identity. However, we are still far from understanding the mechanisms underlying chromatin dynamics in response to DNA damage, which challenges both the structural and functional integrity of chromatin architecture. During my PhD, I thus decided to explore this issue in human cells, by deciphering the dynamics of histone H3 variants and their dedicated chaperones in response to UVC lesions. The main goals of my PhD were to design an experimental setting for visualizing histone H3 dynamics at sites of DNA damage, and to understand the molecular determinants and functional relevance of these dynamics for the restoration of both chromatin structure and transcriptional activity. By combining local UVC irradiation with an innovative technology that allows specific tracking of parental and newly synthesized histones, I revealed that the histone chaperone HIRA (Histone Regulator A) is recruited early to UVC-damaged chromatin regions, where it promotes local deposition of new histone H3.3 variant and facilitates transcription recovery upon repair completion. We also demonstrated that old H3 histones are initially redistributed around damaged chromatin zone, this conservative redistribution requiring the UVC damage sensor DDB2 (DNA Damage Binding protein 2). Later in the repair process, most parental histones recover and mix with newly deposited histones in repairing chromatin regions. The recovery of pre-existing histones may contribute to preserve the integrity of the epigenetic information conveyed by chromatin before genotoxic stress.

Keywords : chromatin assembly ; histone variants ; histone chaperones ; UVC damage ; transcription regulation ; integrity of the epigenetic information