



HAL
open science

Caractérisation de la dynamique de l'ADN-glycosylase OGG1 et de résidus responsables de son interaction avec l'ADN en cellules vivantes

Ostiane d'Augustin de Bourguisson

► To cite this version:

Ostiane d'Augustin de Bourguisson. Caractérisation de la dynamique de l'ADN-glycosylase OGG1 et de résidus responsables de son interaction avec l'ADN en cellules vivantes. Biophysique. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B060 . tel-04096380

HAL Id: tel-04096380

<https://theses.hal.science/tel-04096380>

Submitted on 12 May 2023

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « *Approche Biophysique du Vivant* »

Par

Ostiane D'AUGUSTIN

Caractérisation de la dynamique de l'ADN-glycosylase OGG1 et de résidus responsables de son interaction avec l'ADN en cellules vivantes

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 7 décembre 2022

Unité de recherche : Institut de Génétique et Développement de Rennes – UMR 6290

Rapporteurs avant soutenance :

Dr Joanna TIMMINS
Dr Cyril FAVARD

Directrice de Recherche, Institut de Biologie Structurale, Grenoble
Ingénieur de Recherche HC CNRS, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier

Composition du Jury :

Président :	Dr Yvan CANITROT	Directeur de Recherche CNRS, Centre de Biologie Intégrative, Toulouse
Examineurs :	Dr Joanna TIMMINS	Directrice de Recherche, Institut de Biologie Structurale, Grenoble
	Dr Cyril FAVARD	Ingénieur de Recherche HC CNRS, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier
	Dr Erwan WATRIN	Chargé de Recherche CNRS, Institut de Génétique et Développement de Rennes
Dir. de thèse :	Dr Sébastien HUET	Maître de Conférences, Institut de Génétique et Développement de Rennes
Co-dir. de thèse :	Dr Anna CAMPALANS	Directrice de Recherche CEA, Fontenay-aux-Roses

Table des matières

Remerciements	4
Liste des Figures	13
Liste des Tableaux	14
Liste des Abréviations	15
INTRODUCTION	20
Chapitre I. Dommages et Réparation de l'ADN	22
I. Quels sont les mécanismes à l'origine des dommages de l'ADN ?.....	22
1. Espèces chimiques pouvant endommager l'ADN.....	22
2. Origines des agents oxydants.....	23
a. Formation endogène des ROS.....	24
b. Formation endogène des RNS.....	25
c. Provenance exogène des ROS et RNS.....	27
d. Défenses anti-oxydantes de l'organisme.....	27
3. Altérations dues aux processus cellulaires impliquant l'ADN.....	28
a. Erreurs liées à la réplication.....	28
b. Enzymes modifiant l'ADN.....	29
II. Les différents types de dommages, et leurs mécanismes de réparation associés.....	31
1. Réparation des mésappariement.....	31
2. Réparation par excision de nucléotides.....	34
3. Réparation par excision de base.....	36
4. Réparation des cassures simple-brin.....	40
5. Réparation des cassures double-brin.....	41
III. Quelles sont les conséquences d'un défaut de réparation de l'ADN ?.....	44

1. Mutations ponctuelles et petits indels.....	44
a. Les mutations synonymes.....	44
b. Les mutations faux-sens.....	45
c. Les mutations non-sens.....	46
d. Les petits indels.....	46
2. Réarrangements chromosomiques.....	47
3. Conséquences au niveau cellulaire.....	49
IV. Conclusion du chapitre.....	51
Chapitre II. 8-oxoguanine et OGG1 : lésion et protéine de réparation ou marque	
épigénétique et régulateur de la transcription ?.....	52
I. La 8-oxoguanine, une lésion particulière.....	52
1. Abondance et conséquences de la 8-oxoguanine au sein du génome nucléaire.....	52
2. Prévenir l'accumulation de 8-oxoG dans le génome : le système GO.....	54
II. L'ADN-glycosylase OGG1.....	56
1. Découverte et clonage d'OGG1.....	56
a. Fpg, la 8-oxoguanine ADN-glycosylase procaryote.....	56
b. Clonage d'OGG1 chez les eucaryotes.....	57
2. Structure et Fonctionnement d'OGG1.....	58
a. Structure d'OGG1.....	58
b. Reconnaissance et clivage de la 8-oxoguanine par OGG1.....	59
c. Reconnaissance de la cytosine.....	62
3. Défauts de fonctionnement d'OGG1.....	62
a. OGG1 et cancers.....	62
b. OGG1 et les maladies neurodégénératives.....	63
III. Modulation de la transcription et réponse aux stress oxydants.....	64

1. Mise en évidence de l'implication d'OGG1 dans la régulation de la transcription.....	64
2. Mécanismes de régulation de la transcription via la 8-oxoG.....	65
IV. Conclusion du chapitre.....	67
Chapitre III. Comment une protéine trouve-t-elle sa cible au sein du noyau cellulaire ?	68
I. Structure chromatinienne et diffusion.....	68
1. Les différents niveaux d'organisation de la chromatine.....	68
a. De l'ADN à la chromatine.....	68
b. Boucles et domaines chromatinien.....	70
2. Impact de l'encombrement moléculaire sur la diffusion d'un traceur.....	73
a. Découverte et formulation de la diffusion.....	73
b. Encombrement moléculaire et diffusion.....	74
c. Les différents modèles de diffusion observés en cellules.....	75
i. La diffusion brownienne ou simple diffusion.....	75
ii. La diffusion anormale.....	76
II. Trouver sa cible au sein de l'environnement complexe du noyau.....	77
1. Le modèle des facteurs de transcription.....	78
a. Impact de la structure chromatinienne sur la capacité d'une protéine à trouver sa cible.....	78
b. Mise en évidence de la diffusion facilitée.....	79
c. Modèles sous-tendant la dynamique des protéines de liaison à l'ADN.....	81
2. Le cas des protéines de réparation.....	82
a. Détecter une lésion.....	82
b. Le cas complexe de la 8-oxoG.....	83
III. Conclusion du chapitre.....	84

Chapitre IV. Dynamique des protéines et microscopie confocale.....	86
I. Introduction à la microscopie confocale.....	86
1. Brève histoire de la microscopie.....	86
2. Lumière et Microscopie.....	86
a. Nature de la lumière.....	86
b. Réfraction, réflexion et lois de Snell-Descartes.....	89
c. Lentilles et microscopie optique.....	91
3. Microscopie de fluorescence.....	93
a. Intérêts de la microscopie de fluorescence.....	93
b. Qu'est ce que la fluorescence ?.....	94
c. Résolution.....	97
d. Confocalité et sectionnement optique.....	98
II. Étude des dommages à l'ADN par microscopie de fluorescence.....	99
1. Micro-irradiation et induction de dommages.....	99
2. Dynamique des protéines de réparation.....	103
a. Suivi de particule unique (SPT).....	103
b. Retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP).....	104
c. Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS).....	105
d. Comparaison et complémentarité des trois approches.....	108
III. Conclusion du chapitre.....	109
Objectifs de la thèse.....	110
RÉSULTATS.....	112
I. Contributions différentielles des résidus d'OGG1 impliqués dans les étapes précoces d'investigation de l'ADN.....	114

Identification of key residues of the DNA glycosylase OGG1 controlling efficient DNA scanning and recruitment to oxidized bases in living cells.....	116
INTRODUCTION.....	117
MATERIAL AND METHODS.....	118
RESULTS.....	125
OGG1 alternates between transient binding to DNA and free diffusion when exploring the nuclear space in the absence of external stress.....	125
The efficient recruitment of OGG1 to laser-induced 8-oxoG relies on the direct recognition of the lesion by the DNA glycosylase.....	128
The conserved residue G245 is essential for OGG1 association with DNA.....	132
OGG1 residues involved in base probing differentially impact transient binding to undamaged DNA and accumulation at oxidized bases.....	134
DISCUSSION.....	139
II. Impact de la reconnaissance de la cytosine sur la dynamique d'OGG1.....	151
1. Caractérisation du motif conservé NNN.....	151
2. Étude de l'implication des arginines R154 et R204 dans la reconnaissance de la cytosine et l'interaction avec l'ADN.....	154
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	158
I. Phase de recherche de la lésion.....	160
1. Régime dynamique d'OGG1.....	160
2. Implication de la reconnaissance de la 8-oxoguanine et de la cytosine dans la phase de recherche.....	161
a. Reconnaissance de la 8-oxoguanine.....	161
b. Reconnaissance de la cytosine.....	161
c. Reconnaissance conjointe de la 8-oxoG et de la cytosine.....	163
3. Résidus d'OGG1 impliqués dans l'interaction avec l'ADN.....	164

II. Mécanismes impliqués dans la cinétique de recrutement et relargage d'OGG1 après induction de dommages.....	165
1. Implication de la reconnaissance de la 8-oxoG et de la cytosine dans le recrutement d'OGG1.....	165
a. Reconnaissance de la 8-oxoguanine.....	165
b. Reconnaissance de la cytosine.....	166
c. Reconnaissance conjointe de la 8-oxoG et de la cytosine.....	166
2. Reconnaissance d'autres types de dommages.....	167
3. Implication de cofacteurs dans le recrutement d'OGG1.....	168
4. Excision et relargage d'OGG1 de la zone de dommages.....	169
III. Conclusion et perspectives.....	170
Références Bibliographiques.....	172
Annexes.....	201

Liste des Figures

- Figure 1 Chaîne de transfert d'électrons.
- Figure 2 Fonctionnement de la Réplication.
- Figure 3 Modification de la cytosine.
- Figure 4 Réparation des mésappariements suite à la réplication de l'ADN.
- Figure 5 Dimères de pyrimidine.
- Figure 6 Réparation par Excision de Nucléotides.
- Figure 7 Réparation par Excision de Base.
- Figure 8 Induction d'une cassure double-brin suite à l'effondrement d'une fourche de réplication.
- Figure 9 Principales voies de réparation des cassures double-brin.
- Figure 10 Réarrangements chromosomiques.
- Figure 11 Cascade de réactions permettant la mise en œuvre des checkpoints G1/S et G2/M.
- Figure 12 Différences entre la guanine et la 8-oxoguanine.
- Figure 13 Appariements possibles entre la guanine et la cytosine, la 8-oxoG et la cytosine, et la 8-oxoG et l'adénine
- Figure 14 Représentation schématique du Système GO chez les eucaryotes.
- Figure 15 Structure d'OGG1.
- Figure 16 Alignement partiel des séquences d'OGG1 chez différents organismes.
- Figure 17 Modèle actuel du mécanisme de recherche et reconnaissance de la 8-oxoG par OGG1.
- Figure 18 Structure du site actif d'OGG1 lorsque la 8-oxoG est extrudée.
- Figure 19 Structure des G-quadruplex.
- Figure 20 Structure d'un nucléosome.
- Figure 21 Les différents niveaux de compaction de la chromatine.
- Figure 22 Régulation locale de la structure chromatinienne.
- Figure 23 Structure des trois complexes SMC.
- Figure 24 Isolement ou rapprochement d'éléments du génome par l'intermédiaire du complexe des cohésines et de CTCF.
- Figure 25 Représentation schématique de l'exclusion de volume.
- Figure 26 L'encombrement moléculaire tend à favoriser les formes liées des protéines.
- Figure 27 Impact de l'encombrement moléculaire sur la diffusion d'un traceur.
- Figure 28 Exploration compacte et non-compacte.
- Figure 29 Impact de la distance d entre le point de départ du traceur et sa cible, en exploration compacte et non-compacte.
- Figure 30 Représentation schématique de la diffusion facilitée et des différents modes de diffusion impliqués.

Figure 31	Spectre des ondes électromagnétiques.
Figure 32	Propagation d'une onde électromagnétique.
Figure 33	Polarisation linéaire de la lumière.
Figure 34	Réfraction et Réflexion.
Figure 35	Décomposition de la lumière par un prisme.
Figure 36	Lentilles convergentes et divergentes.
Figure 37	L'œil est sensible à l'angle sous lequel il voit les objets et non leurs tailles réelles.
Figure 38	Fonctionnement d'un microscope.
Figure 39	Fonctionnement de la fluorescence.
Figure 40	Diffraction et ouverture numérique.
Figure 41	Comparaison d'un microscope à champ large et confocal.
Figure 42	Représentation schématique de l'induction de dommages par micro-irradiation.
Figure 43	Représentation schématique d'une expérience de FRAP.
Figure 44	Principe de la FCS.
Figure 45	Principaux paramètres obtenus grâce à la FCS.
Figure 46	Impact des mutations du motif NNN sur la dynamique et la cinétique de recrutement d'OGG1.
Figure 47	Implication des arginines R154 et R204 dans la dynamique et le recrutement d'OGG1.
Figure 48	Interactions entre OGG1 et l'ADN à différentes étapes de la recherche de la 8-oxoG.
Figure 49	Vue rapprochée sur le motif NNN pour OGG1 WT et 2NA.

Liste des Tableaux

Tableau 1	Résumé de la formation endogène des ROS et RNS ayant la plus grande importance biologique.
Tableau 2	ADN-glycosylases présentes chez les mammifères.
Tableau 3	Différents modes de micro-irradiation laser, et les types de dommages induits.
Tableau 4	Comparaison des trois techniques SPT, FRAP et FCS.
Tableau 5	Affinité et activité d'OGG1 WT et des mutants F319A, H270A et H270L sur leurs différentes cibles.

Liste des Abréviations

•OH	Radical hydroxyle
•NO	Oxyde Nitrique, Monoxyde d'Azote
¹ O ₂	Oxygène singulet
3-meA	3-méthyladénine
3-meG	3-méthylguanine
5,6-DHU	5,6-Dihydrouracil
5-caC	5-carboxycytosine
5-fC	5-formylcytosine
5-fU	5-formyluracile
5-hmC	5-hydroxyméthylcytosine
5-hmU	5-hydroxyméthyluracile
5-hoC	5-hydroxycytosine
5-hoU	5-hydroxyuracile
5-mC	5-méthylcytosine
6,4-PP	Photoproduits 6,4-Pyrimidine-Pyrimidione
7-meG	7-méthylguanine
8-oxoG, °G	7,8-dihydro-8-oxoguanine
εA	1,N ⁶ -ethenoadénine
γH2AX	Histone H2AX phosphorylé
λ	Longueur d'onde
AA	Acide Aminé
AAG	3-alkyladénine ADN-Glycosylase (=MPG)
AID	Déaminases Induites par l'Activation (<i>Activation Induced Deaminase</i>)
AP	apurinique/apyrimidique
APE1	AP-endonucléase 1
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>ATM-related protein</i>
ATP	Adénosine Triphosphate
BER	Réparation par Excision de Base (<i>Base Excision Repair</i>)
BrdU	Bromodeoxyuridine
CacOGG	Protéine OGG de <i>Clostridium acetobutylicum</i>

cAMP	Adénosine monophosphate cyclique (<i>cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
CPD	Dimères de Pyrimidines Cyclobutyliques (<i>Cyclobutane Pyrimidine Dimers</i>)
CRE	<i>cAMP Response Element</i>
CREB	<i>Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) Response Element Binding protein</i>
CSA/B	<i>Cockayne Syndrome A/B</i>
D	Coefficient de Diffusion
DBP	Protéine de liaison à l'ADN (<i>DNA Binding Protein</i>)
DDR	Réponse aux dommages de l'ADN (<i>DNA Damage Response</i>)
dGMP	déoxyguanosine monophosphate
dGTP	déoxyguanosine triphosphate
DIC	Contraste d'Interférence Différentielle (<i>Differential Interference Contrast</i>)
DNA-PKc	Sous-unités catalytiques des protéines kinases dépendantes de l'ADN (<i>DNA-dependent Protein Kinase Catalytic subunit</i>)
DNMT	ADN méthyltransférase (<i>DNA MethylTransferase</i>)
ds	Double-Brin (<i>Double Strand</i>)
DSB	Cassure Double-Brin (<i>Double Strand Break</i>)
DHT	Dihydroxythymine
FAP	Protéine Activée par un Fluorogène (<i>Fluorogen Activating Protein</i>)
FapyA	4,6-diamino-5-formamidopyrimidine
FapyG	2,6-diamino-4-oxo-5-formamidopyrimidine
FCS	Spectroscopie de Corrélacion de Fluorescence (<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i>)
Fe ²⁺	Cation Ferreux
Fe ³⁺	Cation Ferrique
FEN1	<i>Flap Endonuclease 1</i>
Fpg	Formamidopyrimidine ADN-glycosylase
FRAP	Retour de Fluorescence Après Photoblanchiment (<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>)
G4	G-quadruplex
GG-NER	NER sur génome entier (<i>Global Genome NER</i>)
Gh	Guanidinohydantoïne
GPD	Motif Gly/Pro-riche + Asp
H1/2A/2B/3/4	Histone 1/2A/2B/3/4

H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H2TH	Hélice-2-tours-Hélice
HhH	Hélice-coude-Hélice (<i>Helix-hairpin-Helix</i>)
HO ⁻	Anion Hydroxyde
HR	Recombinaison Homologue (<i>Homologous Recombination</i>)
HR23B	Homologue Humain B de Rad23 (<i>Human Rad23 homolog B</i>)
Indel	Insertions/Délétions
IR	Infra-Rouge
KBrO ₃	Bromate de Potassium
KR	KillerRed
LAD	Domaine Associé à la Lamina (<i>Lamina Associated Domain</i>)
lp-BER	Voie longue du BER (<i>long-patch BER</i>)
MBD4	<i>Methyl-CpG-binding domain protein 4</i>
meFapyG	2,6-diamino-4-hydroxy-5- <i>N</i> -methylformamidopyrimidine
meG	Méthylguanine
MLH	Homologue de MutL (<i>MutL Homolog</i>)
MMR	Réparation des Mésappariements (<i>Mismatch Repair</i>)
MMS	Méthyle Méthane Sulfonate
MPG	<i>N</i> -méthylpurine ADN-Gglycosylase (=AAG)
MSD	Déplacement Quadratique Moyen (<i>Mean Square Displacement</i>)
MSH	Homologue de MutS (<i>MutS Homolog</i>)
MTH1	Homologue de MutT 1 (<i>MutT Homolog 1</i>)
MUTYH	Homologue de MutY (<i>MutY Homolog</i>)
n	Indice de Réfraction
N-ter	N-terminal
NA	Ouverture Numérique (<i>Numerical Aperture</i>)
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NEIL1/2/3	Endonucléase VIII-like 1/2/3
NER	Réparation par Excision de Nucléotides (<i>Nucleotide Excision Repair</i>)
NHEJ	Jonction de brins non-homologue (<i>Non-Homologous End Joining</i>)
NO ⁻	Anion Nitroxyle
NO ₂ •	Dioxyde d'Azote

NO ₂ ⁻	Nitrite
NOS	Oxyde Nitrique Synthase (<i>Nitric Oxid Synthase</i>)
NTH1	Nth endonucléase III-like 1
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
O ₃	Ozone
OGG1	7,8-dihydro-8-oxoguanine ADN-Glycosylase
ONOO ⁻ /ONOOH	Peroxynitrite
O ₂ NOO ⁻	Peroxytnitrate
PALM	Microscopie par Localisation Photoactivée (<i>Photo-Activated Localization Microscopy</i>)
PAR	Poly(ADP-ribose)
PARP1	Poly(ADP-ribose) poulymérase 1
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIC	Complexe de Pré-Incision (<i>Pre-Incision Complex</i>)
PNK	PolyNucléotide Kinase
Pol	Polymérase
QY	Rendement Quantique (<i>Quantum Yield</i>)
redox	Oxydo-réduction
RFC	Facteur de Réplication C (<i>Replication Factor C</i>)
RNS	Espèce Réactive de l'Azote (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROO•	Radical peroxyde
ROS	Espèce Réactive de l'Oxygène (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPA	Protéine de Réplication A (<i>Replication Protein A</i>)
SMC	Protéines de Maintenance Structurale des Chromosomes (<i>Structure Maintenance of Chromosomes</i>)
SMUG1	<i>Single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase</i>
SOD	Superoxyde Dismutase
sp-BER	Voie courte du BER (<i>short-patch BER</i>)
Sp	Spiroiminodihydantoine
SPT	Suivi de Particule Unique (<i>Single Particle Tracking</i>)
ss	Simple-brin (<i>Single Strand</i>)

SSB	Cassure Simple-Brin (<i>Single-Strand Break</i>)
SSBR	Voie de Réparation des Cassures Simple-Brin (<i>Single-Strand Break Repair</i>)
TAD	Domaines Topologiquement Associés (<i>Topologically Associated Domains</i>)
TC-NER	NER Couplé à la Transcription (<i>Transcription-Coupled NER</i>)
TCR	Réparation Couplée à la Transcription (<i>Transcription-Coupled DNA Repair</i>)
TDG	Thymine ADN-Glycosylase
TET	<i>Ten-Eleven Translocation</i>
TF	Facteur de Transcription (<i>Transcription Factor</i>)
TG	Thymine-Glycol
THF	Tetrahydrofuranyl
UDG	Uracile ADN-Glycosylase (Procaryote)
UNG	Uracile ADN-Glycosylase (Eucaryote)
UV	Ultra Violet
UVSSA	<i>UV-Stimulated Scaffold Protein A</i>
WF	Champ Large (<i>Wide Field</i>)
WT	Sauvage (<i>Wild Type</i>)
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA-G	Xeroderma pigmentosum groupes A-G
XRCC1	<i>X-ray Repair Cross-Complementing protein 1</i>

INTRODUCTION

Chapitre I. Dommages et Réparation de l'ADN

L'ADN, porteur de l'information génétique et nécessaire au bon fonctionnement de la cellule, est en permanence soumis à de nombreux stress, menaçant ainsi son intégrité et donc le bon fonctionnement cellulaire. Il est donc essentiel qu'une surveillance minutieuse soit effectuée, afin de prévenir, ou tout du moins limiter, les dysfonctionnements cellulaires. En effet, les conséquences d'une mauvaise réparation de l'ADN sont nombreuses et délétères. Ainsi, les défauts de réparation de l'ADN ont été associés au vieillissement prématuré [Tiwari & Wilson, 2019; Vijg, 2021] et à l'apparition de différentes maladies telles que les cancers [Basu, 2018; Tiwari & Wilson, 2019], ou certaines maladies neurodégénératives [Tiwari & Wilson, 2019].

I. Quels sont les mécanismes à l'origine des dommages de l'ADN ?

1. Espèces chimiques pouvant endommager l'ADN

Les principaux agents en mesure d'endommager l'ADN sont les espèces réactives de l'oxygène (ROS – *Reactive Oxygen Species*) et de l'azote (RNS – *Reactive Nitrogen Species*). Comme leurs noms l'indiquent, elles sont respectivement dérivées de l'oxygène et de l'azote, et incluent différents types de composés chimiques à forte capacité réactive. Ils peuvent être divisés en deux catégories : les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires. Les espèces radicalaires, aussi appelées radicaux libres, sont des espèces chimiques présentant au moins un électron libre sur la couche de valence, ce qui les rend instables et promptes à réagir avec les molécules environnantes. Du côté des ROS, ce sont principalement l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$) ou le radical peroxyde ($ROO\cdot$) ; et l'oxyde nitrique ($\cdot NO$, ou monoxyde d'azote), ou le dioxyde d'azote ($NO_2\cdot$) pour les RNS [Sies, 2017; Pisoschi *et al.*, 2021]. Parmi les espèces non radicalaires, nous pouvons citer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) ou l'ozone (O_3) pour les ROS ; et le nitrite (NO_2^-), l'anion nitroxyle (NO^-), le peroxydinitrite ($ONOO^-$) ou le peroxydinitrate (O_2NOO^-) du côté des RNS [Sies 2017; Pisoschi *et al.*, 2021]. Leurs pouvoirs oxydants sont généralement plus faibles que ceux des radicaux libres, mais ils sont souvent les précurseurs de ces derniers. Si, comme nous le verrons par la suite, ils sont essentiels au métabolisme cellulaire en conditions physiologiques [Birben *et al.*, 2012; Pisoschi & Pop 2015; Sies 2017; Pisoschi *et al.*, 2021], un excès de ROS/RNS peut être à l'origine d'un stress oxydant ; défini comme une altération de

l'équilibre entre la quantité d'espèces oxydantes présentes dans le milieu, et les défenses antioxydantes de l'organisme [Birben *et al.* 2012; Pisoschi & Pop, 2015; Sies, 2017].

D'autres éléments que l'oxygène ou l'azote peuvent être à l'origine d'espèces réactives pouvant potentiellement induire un stress oxydant, comme c'est le cas du soufre, du chlore, du brome ou du sélénium [Sies, 2017], mais leur importance biologique étant moindre, ils ne seront pas traités ici.

2. Origines des agents oxydants

La source endogène la plus évidente de ROS est la respiration cellulaire, fonction essentielle du métabolisme permettant la synthèse de d'adénosine triphosphate (ATP), l'énergie de la cellule. La respiration cellulaire se déroule dans la mitochondrie, au niveau de la chaîne de transfert d'électrons. On appelle ainsi une succession de cinq complexes protéiques transmembranaires, localisés dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 1) et qui, grâce à une succession de réactions d'oxydo-réduction, permettent la formation d'un gradient de protons entre l'espace intermembranaire et la

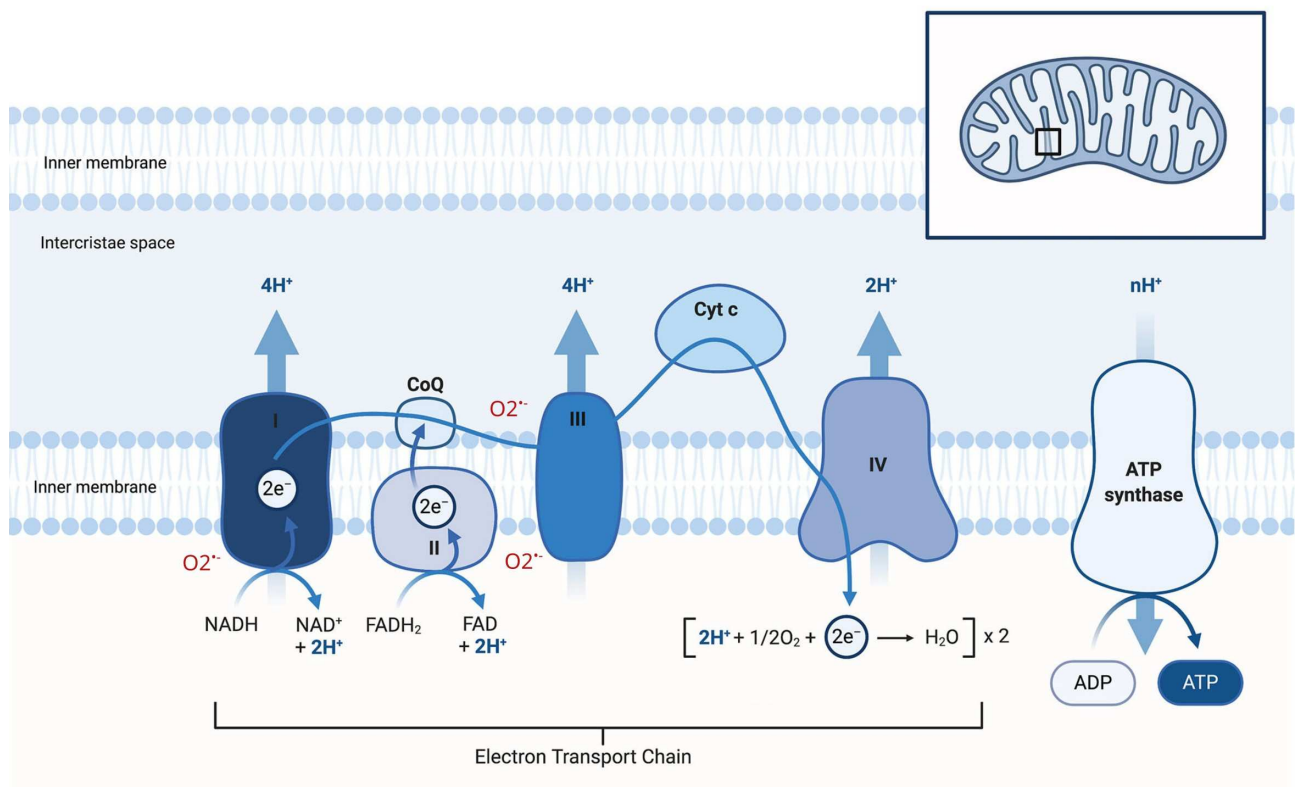


Figure 1: Chaîne de transfert d'électrons. Les complexes I à IV permettent le transport des électrons et la création du gradient de protons, tandis que le complexe V synthétise l'ATP. Adapté de Prasuhn *et al.*, 2021.

matrice mitochondriale. Ce gradient est utilisé par une pompe à protons afin de générer l'ATP nécessaire au métabolisme cellulaire.

Cependant, de nombreux autres processus cellulaires physiologiques impliquent la formation de ROS ou RNS, comme la transduction de différents signaux ou l'activation d'une réponse immunitaire [Birben *et al.*, 2012; Pisoschi & Pop 2015]. En effet, certaines cellules immunitaires (neutrophiles, éosinophiles, granulocytes, etc.) génèrent des poussées de radicaux libres afin de lutter contre les invasions pathogènes. Ainsi, plus d'une trentaine d'enzymes produisant du H_2O_2 a été répertoriée [Pisoschi *et al.*, 2021]. Il ne s'agira donc pas de dresser une liste exhaustive des différents mécanismes cellulaires en mesure de créer des ROS ou RNS, mais de brosser un portrait des plus importants.

a. Formation endogène des ROS

Les trois types de ROS ayant la plus grande importance d'un point de vue physiologique sont l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène, soit du fait de leur forte réactivité ($\bullet OH$), soit car ce sont des précurseurs d'autres espèces réactives ($O_2^{\bullet -}$ et H_2O_2) (Tableau 1) [Birben *et al.*, 2012; Pisoschi *et al.*, 2021]. L'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ est formé par l'ajout d'un électron à une molécule de dioxygène [Birben *et al.*, 2012]. Ce processus a majoritairement lieu dans la mitochondrie au niveau de la chaîne de transport des électrons ; mais également dans le peroxysome ou lors de l'activation de réponses immunitaires [Birben *et al.*, 2012; Pisoschi & Pop, 2015]. Dans ce cas-là, l'ajout d'électron au dioxygène est médié par différentes enzymes comprenant la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, la xanthine oxydase ou la cyclo-oxygénase [Birben *et al.*, 2012; Pisoschi & Pop 2015]. L'anion superoxyde peut lui-même être converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par dismutation, soit spontanément, soit grâce à l'action de superoxyde dismutases (SOD). Par conséquent, le peroxyde d'hydrogène peut être formé suite à n'importe quel processus générant des anions superoxydes. Certaines enzymes peuvent également être à l'origine de la formation de H_2O_2 , comme c'est le cas de la NADPH oxydase, de la xanthine oxydase ou de l'amino-acide oxydase [Birben *et al.* 2012]. Le peroxyde d'hydrogène peut à son tour être à l'origine de la formation du radical hydroxyle ($\bullet OH$), par l'intermédiaire de la réaction de Fenton. Cette réaction d'oxydo-réduction, découverte en 1894 par le chimiste anglais Henry J. H. Fenton [Fenton, 1894], fait intervenir des sels minéraux pouvant être réduits, permettant ainsi la formation de radicaux hydroxyles et d'anions hydroxydes ($HO^{\bullet -}$) (Tableau 1) [Birben *et al.* 2012 ; Pisoschi & Pop 2015]. La réaction la plus connue est celle mise en évidence par Fenton, impliquant le fer. D'autres métaux tels que le cuivre, le chrome, le nickel ou le cobalt peuvent également servir de

donneurs d'électrons dans des réactions de type Fenton [Valko *et al.*, 2005]. Le $\bullet\text{OH}$ résultant de ces réactions est le ROS ayant le plus fort pouvoir oxydant, et est en capacité d'oxyder la plupart des molécules cellulaires (lipides, protéines, acides nucléiques, etc.) [Gutteridge, 1994 ; Pisoschi & Pop 2015].

b. Formation endogène des RNS

Les deux RNS de plus grande importance biologique sont l'oxyde nitrique ($\bullet\text{NO}$) et le peroxyde nitrite (ONOO^-) (Tableau 1) [Pisoschi *et al.*, 2021]. L'acide nitrique est synthétisé par les oxyde nitrique synthases (NOS – *Nitric Oxid Synthase*), en général en réponse à une demande physiologique (neurotransmission, réponse immunitaire, vasodilatation, etc.) [Pisoschi & Pop, 2015] à partir de NADPH et de L-arginine [Knowles & Moncada, 1994]. La synthèse de $\bullet\text{NO}$ nécessite une réaction complexe, en deux étapes, et impliquant quatre co-facteurs en plus du NADPH et de la L-arginine déjà mentionnés, ainsi que la présence de calmoduline (Tableau 1) [Knowles & Moncada, 1994]. On retrouve principalement les NOS dans les tissus endothéliaux, neuronaux et les cellules immunitaires. Dans les deux premiers cas, l'activité des NOS est constitutive, alors qu'elle est induite dans les cellules immunitaires, en réponse à une agression externe. Par la suite le $\bullet\text{NO}$ permet la formation de peroxyde nitrite par interaction avec l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [Squadrito & Pryor, 1998; Pisoschi & Pop, 2015; Zaja-Milatovic & Gupta, 2015]. Les myéloperoxydases peuvent également catalyser la dégradation du peroxyde d'hydrogène en différents composés, dont le peroxyde nitrite [Pisoschi *et al.*, 2021]. De façon similaire au radical hydroxyle, la forme protonée du peroxyde nitrite (ONOOH) est un puissant oxydant, en capacité d'endommager de nombreux types de biomolécules, qu'il s'agisse de lipides, protéines ou acides nucléiques [Pisoschi & Pop, 2015].

Tableau 1 : Résumé de la formation endogène des ROS et RNS ayant la plus grande importance biologique

Nom	Formule Chimique	Radicalité	Formation Chimique	Enzyme(s) et/ou type de réaction	Lieu(x) de formation endogènes
<i>Espèces Réactives de l'Oxygène</i>					
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	Radical libre	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$	Chaîne de transport d'électrons NADPH oxydase, xanthine oxydase, cyclo-oxygénase	Mitochondrie Peroxysome, Réponse immunitaire
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Non radicalaire	$2H^+ + 2O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Dismutation du $O_2^{\cdot-}$ (spontanée ou SOD)	Partout où se trouve du $O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	$\cdot OH$	Radical libre	$H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + \cdot OH$	Réaction de Fenton	Milieus cellulaire et extra-cellulaire
<i>Espèces Réactives de l'Azote</i>					
Oxyde nitrique	$\cdot NO$	Radical libre	$2L\text{-arginine} + 3NADPH + 3H^+ + 4O_2 \rightarrow 2\text{citrullines} + 2\cdot NO + 4H_2O + 3NADP^+$	NOS	Tissus endothéliaux et neuronaux, cellules immunitaires
Peroxynitrite	$ONOO^- / ONOOH$	Non radicalaire	$\cdot NO + O_2^{\cdot-} \rightarrow ONOO^-$	Réaction spontanée ou myéloperoxydases	Milieu cellulaire

c. Provenance exogène des ROS et RNS

Comme évoqué précédemment, les agents oxydants, tant ROS que RNS, peuvent résulter du métabolisme cellulaire physiologique ; et même y participer en tant que molécules transductrices de signaux ou actrices de la réponse immunitaire. Cependant, une part non négligeable de ces agents dommageables provient de sources exogènes auxquelles nous sommes continuellement exposés : rayonnements ionisants ou ultraviolets, fumée de cigarette, pollutions diverses, etc. Pour donner quelques exemples, les métaux lourds (le cuivre ou le fer ayant la plus grande importance biologique à défaut d'être les plus toxiques en tant que tels [Miller *et al.*, 1990]), favorisent les réactions de Fenton en fournissant les donneurs d'électrons nécessaires à la réaction, permettant ainsi la formation de radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) [Birben *et al.*, 2012] ; mais ces derniers peuvent également provenir de la radiolyse de l'eau [Gutteridge, 1994 ; Pisoschi & Pop, 2015]. La fumée de cigarette quant à elle contient de nombreux agents oxydants, mais active en plus les réponses immunitaires dans les poumons, générant une accumulation de neutrophiles et macrophages, qui eux-mêmes produisent des ROS, augmentant encore le stress oxydatif subi [Birben *et al.* 2012].

d. Défenses anti-oxydantes de l'organisme

Étant donné la variabilité des espèces oxydantes en mesure d'endommager l'ADN, mais également les autres composés cellulaires environnants (principalement les protéines et les lipides), différents mécanismes de défense contre les stress oxydants ont été mis en place au cours de l'évolution. Ils peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques et se regroupent en trois catégories : prévention, interception et réparation [Sies, 2017 ; Pisoschi *et al.*, 2021]. Le but des défenses anti-oxydantes préventives est, comme leur nom l'indique, d'éviter l'apparition d'un stress oxydant. C'est par exemple le cas de la production cutanée de mélanine qui protège des rayons du Soleil. Les défenses interceptrices agissent durant le stress oxydant, en essayant de limiter les effets délétères, généralement en évitant ou arrêtant les réactions en chaînes. On retrouve dans cette catégorie un certain nombre d'enzymes, telles que les SOD ou les catalases (réduisent le H_2O_2 en H_2O), ou de composés non-enzymatiques, comme les vitamines C et E ou le β -carotène, qui nettoient l'environnement cellulaire ou extra-cellulaire en prenant en charge les composés oxydants ou risquant de se transformer en radicaux libres [Birben *et al.*, 2012 ; Sies, 2017 ; Pisoschi *et al.*, 2021]. La limite entre ces deux premières catégories est assez floue, étant donné que plusieurs défenses anti-oxydantes interceptrices sont également préventives. En effet, elles n'attendent pas la survenue d'un stress oxydant pour contrecarrer l'action des espèces oxydantes (présentes en permanence, même en

dehors des périodes de stress). Enfin, les défenses anti-oxydantes de réparation agissent après la survenue d'un dommage, que ce soit en réparant le dommage directement (et permettant donc de restaurer l'état initial), ou en menant à sa dégradation afin d'éviter son accumulation dans la cellule [Sies, 2017 ; Pisoschi *et al.*, 2021].

3. Altérations dues aux processus cellulaires impliquant l'ADN

Loin d'être une molécule inerte, l'ADN est le siège d'une cohorte de processus cellulaires indispensables à la vie : réplication, transcription, réparation, modulation de l'état de compaction de la chromatine, etc. Chacun de ces mécanismes est susceptible d'induire des modifications de l'ADN.

a. Erreurs liées à la réplication

L'un des principaux mécanismes impliquant l'ADN et à risques d'altérer la stabilité génétique, est, paradoxalement, la réplication (Figure 2A), et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, malgré l'excellente fidélité des ADN polymérases (pol) principales (δ pour le brin retardé, et ϵ pour le brin précocé), leurs mécanismes de relecture et la réparation associés à la réplication, des mésappariements peuvent survenir. Cependant, on estime que seulement un mésappariement survient tous les milliards de paires de bases, ce qui est extrêmement faible (Figure 2B) [McCulloch & Kunkel, 2008]. Mais d'autres facteurs peuvent entrer en jeu, certains inhérents aux spécificités de la séquence répliquée, d'autres plus généraux. Ainsi, les répétitions en tandem, plus susceptibles d'adopter des structures secondaires différentes de la double hélice en ADN-B (épingles à cheveux, G-quadruplex (G4)), peuvent perturber le fonctionnement de l'ADN polymérase et mener à des insertions/délétions (indels) lorsqu'elles sont présentes en amont de la fourche [Kim & Mirkin, 2013; Madireddy & Gerhardt, 2017]. Dans les cas extrêmes, ces structures secondaires particulières peuvent mener à l'effondrement de la fourche de réplication et par conséquent, à des cassures double-brin (les différents types de dommages seront détaillés plus loin) [Madireddy & Gerhardt, 2017]. Ces structures peuvent également apparaître dans le brin en cours de réplication, menant alors à un dérapage de l'ADN polymérase et générant des expansions de la séquence répétée [Kim & Mirkin 2013]. Par ailleurs, une mauvaise ligation des fragments d'Okazaki sur le brin retardé peut générer des cassures simple-brin.

Enfin, la séquence en cours de réplication peut elle-même être endommagée. Selon le type de dommages, l'une, l'autre ou les deux pol δ/ϵ peuvent être bloquées ou non [Ler & Carty, 2021]. Un blocage de ces polymérases peut générer des cassures ayant le potentiel d'induire une forte instabilité

généétique. Afin d'éviter des conséquences aussi dramatiques, des mécanismes permettant la réplication malgré la présence de dommages bloquant les polymérase principales existent, entraînant généralement le recrutement de polymérase spécialisées dans la synthèse translésionnelle de l'ADN. Cependant, ces polymérase spécialisées ne sont pas nécessairement aussi fidèles que les pol δ/ϵ , d'autant plus que cette fidélité peut dépendre des lésions rencontrées [Abbotts & Wilson, 2017 ; Ignatov *et al.*, 2017 ; Ler & Carty, 2021].

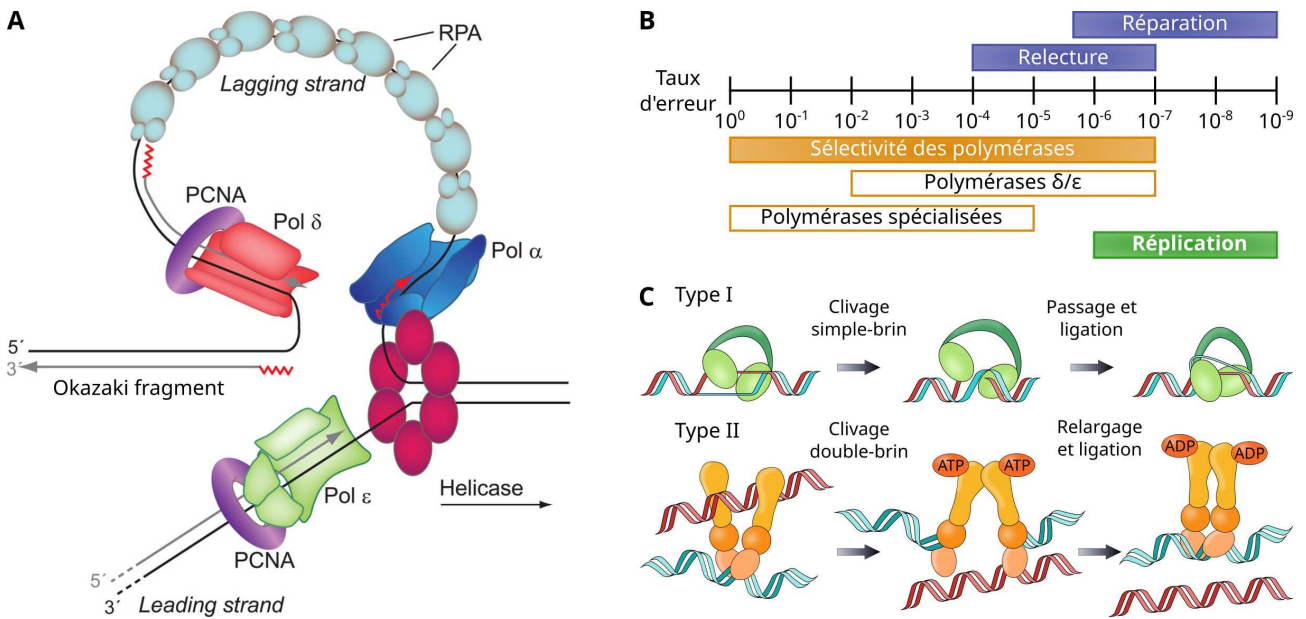


Figure 2: Fonctionnement de la réplication et risques de dommages associés. A. L'hélicase sépare les deux brins de la double hélice. La polymérase α synthétise une amorce d'ARN (zigzags rouges) qui sert de support aux polymérase δ (brin retardé, stabilisé par RPA (*Replication Protein A*)) et ϵ (brin précoce). PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) permet d'augmenter la processivité des ADN polymérase. Adapté de McCulloch & Kunkel, 2008. B. Taux d'erreurs atteints par les différentes étapes de la réplication (synthèse par les polymérase, relecture, et réparation associée à la réplication). D'après McCulloch & Kunkel, 2008. C. Fonctionnement des topoisomérases de type I (haut) et II (bas). Les topoisomérases de type I coupent un brin de l'ADN et le font contourner le deuxième avant de le religuer. Celles de type II coupent les deux brins d'une molécule d'ADN et font passer une deuxième molécule entre les deux morceaux de la première, avant de la religuer. D'après McKinnon, 2016.

b. Enzymes modifiant l'ADN

Toujours en lien avec la réplication, mais sans être directement impliquée dans la synthèse des nouveaux brins, les topoisomérases sont des enzymes capables de couper et religuer un seul (type I) ou les deux brins (type II) de l'ADN (Figure 2C). En effet, la progression du complexe de réplication le long de la double hélice induit un sur-enroulement positif en aval du réplisome. Si ce

sur-enroulement n'est pas soulagé, il peut induire l'arrêt du complexe et bloquer la réplication [Pommier *et al.*, 2022], avec les conséquences mentionnées plus haut. Il est donc essentiel de pouvoir relâcher ce sur-enroulement au fur et à mesure, afin de permettre le bon déroulement de la réplication. D'une manière plus générale, les topoisomérases sont impliquées dans la gestion de la topologie de l'ADN, et permettent de démêler les inévitables nœuds inhérents à la compaction de l'ADN dans le noyau. Cependant, dans le cas où la ligation serait imparfaite, l'action de ces enzymes peut se traduire par l'apparition de cassures simple ou double-brin [Capranico *et al.*, 2017 ; Pommier *et al.*, 2022].

Par ailleurs, afin de réguler différents processus impliquant l'ADN, à commencer par la transcription, plusieurs enzymes le modifient, principalement par la modification des cytosines. Ainsi, les ADN méthyltransférase (DNMT – *DNA MethylTransferase*) ajoutent des groupements méthyle sur le carbone 5 des cytosines (5-mC), marque associée à une réduction de la transcription [Lejart *et al.*, 2018]. Par la suite, la 5-mC peut subir plusieurs étapes d'oxydation successives par l'intermédiaire des enzymes TET (*Ten-Eleven Translocation*), la transformant en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC), puis 5-formylcytosine (5-fC) et enfin 5-carboxycytosine (5-caC) (Figure 3A) [Lejart *et al.*, 2018]. Les cytosines peuvent également être déaminées en uraciles, de

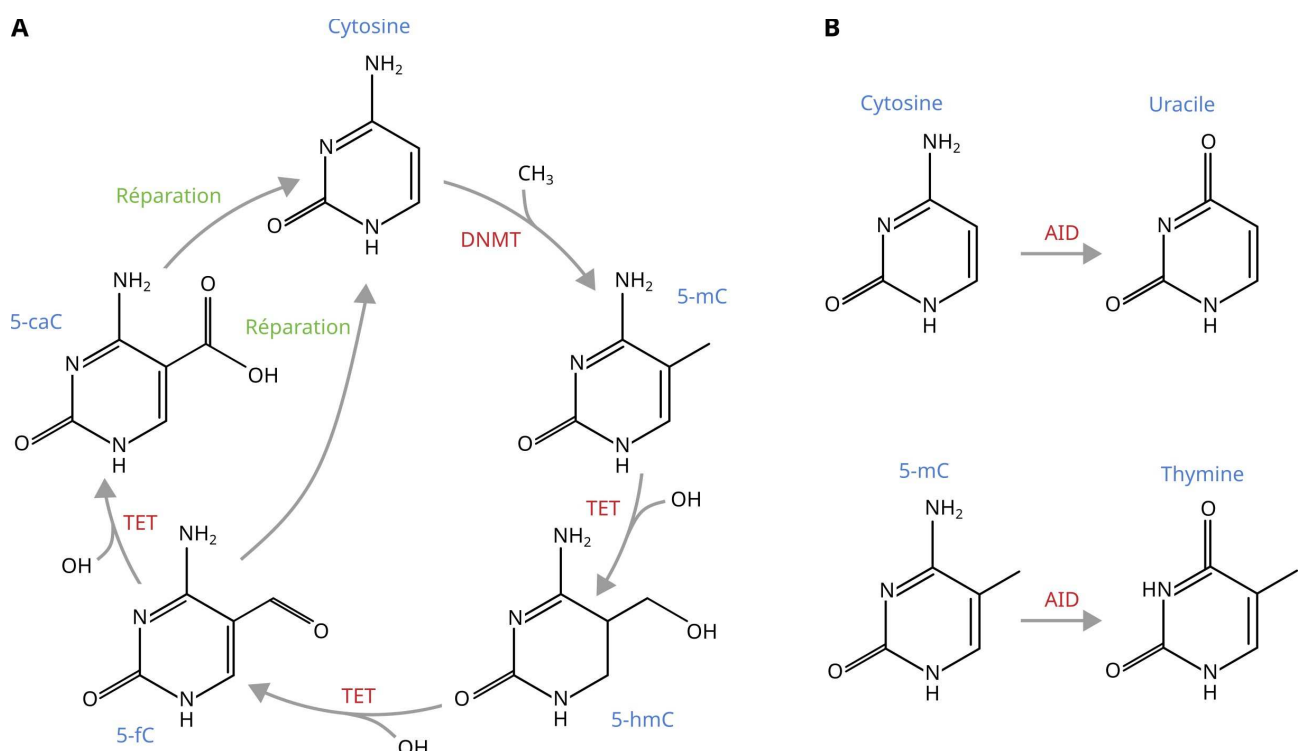


Figure 3: Modification de la cytosine. A. Cycle de méthylation/oxydation de la cytosine par les DNMT et TET, respectivement. Les deux dernières formes peuvent être reconnues par les voies de réparation. D'après Lejart *et al.*, 2018. **B.** Déamination de la cytosine et de la 5-mC. D'après Nabel *et al.*, 2012.

même que les 5-mC en thymine, quoi que moins efficacement, par les déaminases de la famille AID/APOBEC (Figure 3B) [Nabel *et al.*, 2012 ; Lejart *et al.*, 2018].

II. Les différents types de dommages, et leurs mécanismes de réparation associés

Les agents oxydants ou les processus intervenant sur l'ADN peuvent être à l'origine de types de dommages très variés. Tous n'ont pas les mêmes conséquences sur l'intégrité génétique et ne sont pas aussi simples à détecter les uns que les autres. Des mécanismes de surveillance et de réparation spécifiques, souvent désignés sous le terme générique de « réponse aux dommages de l'ADN » (DDR – *DNA Damage Response*) ont donc émergé au cours de l'évolution afin de répondre aux différents défis causés par la variété de types de dommages.

1. Réparation des mésappariement

Les mésappariements résultent principalement d'erreurs lors de la réplication qui échappent à la relecture des polymérase δ/ϵ , et sont réparés par la voie de réparation des mésappariements (MMR – *Mismatch Repair*) (Figure 4), associée à la réplication [Hsieh & Zhang, 2017]. Ces mésappariements peuvent être de deux types : soit un mauvais appariage base à base, soit un indel présent uniquement sur le brin néosynthétisé généré par un dérapage de l'ADN polymérase [Putnam, 2021]. Il est à noter que le MMR n'est pas encore complètement compris, et que plusieurs incertitudes demeurent. Le mécanisme décrit ci-après est donc le modèle qui semble faire le plus consensus dans l'état actuel de la littérature.

La voie du MMR est initiée par la reconnaissance du mésappariement par les homologues de MutS (MSH – *MutS Homolog*). MSH2-MSH6 (MutS α) détectent la présence des mésappariements base à base et les petits indels (1-2 nucléotides), tandis que MSH2-MSH3 (MutS β) détectent les indels plus longs (1-15 nucléotides) [Hsieh & Zhang, 2017]. La discrimination du nouveau brin est une étape essentielle du MMR afin de ne pas « réparer » le brin modèle, ce qui rendrait le processus d’autant plus mutagène. Pour ce faire, il semblerait que le nouveau brin soit reconnu par la présence de trous le long de sa séquence, pouvant provenir de plusieurs origines [Putnam, 2021]. La plus évidente est la présence de discontinuités sur le brin retardé avant la ligation des fragments d’Okazaki. Le système de reconnaissance du brin précoce est moins bien compris, même s’il

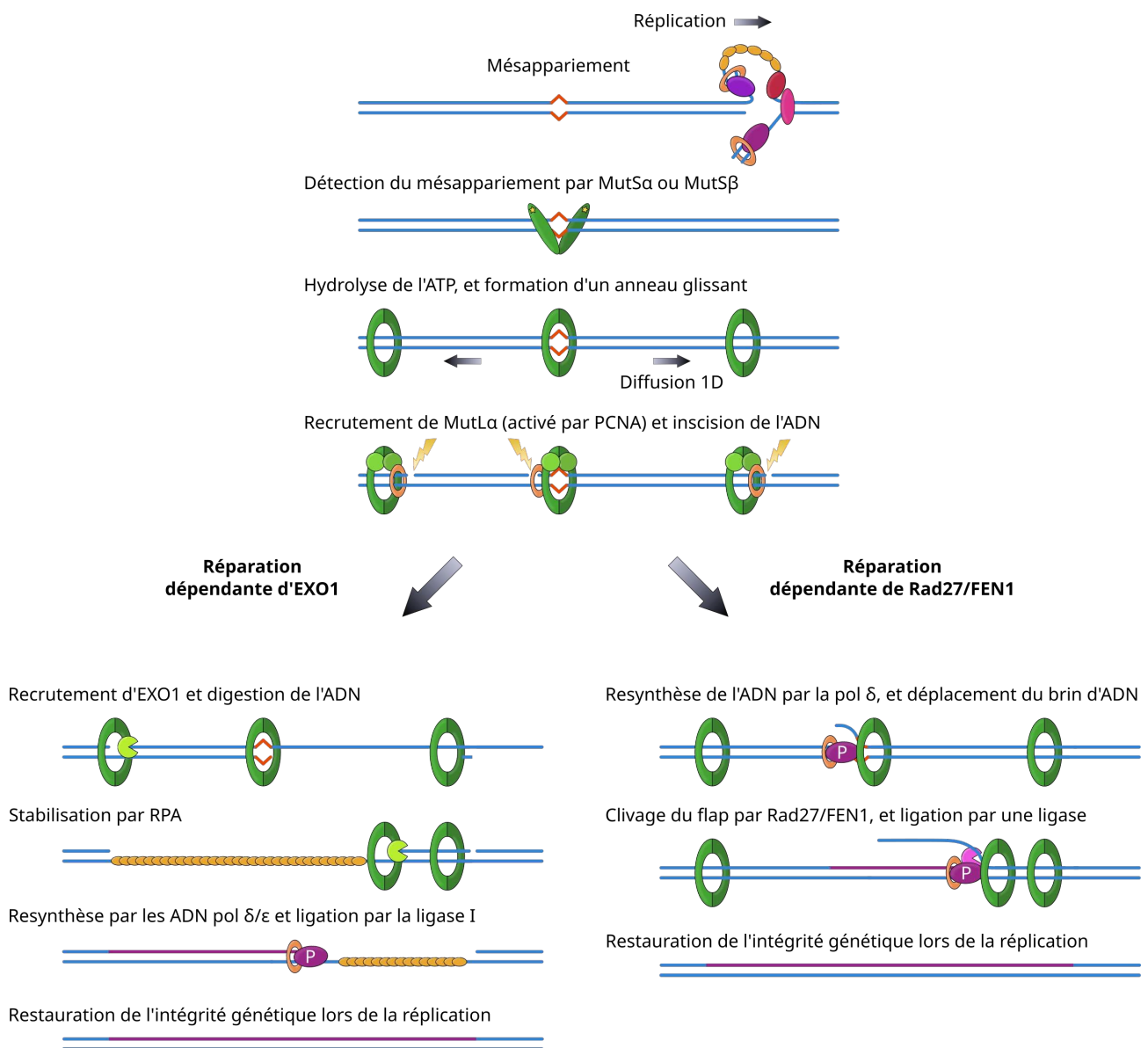


Figure 4: Réparation des mésappariements suite à la réplication de l'ADN. P : Polymérase.

semblerait qu'il soit également basé sur la détection de discontinuités, pouvant provenir de l'insertion incorrecte de ribonucléotides, par la suite excisés [Putnam, 2021]. La présence de PCNA, jouant un rôle clé dans la réplication et étant liée au brin matrice pourrait aussi participer à l'identification du brin à corriger [Putnam, 2021]. La détection du mésappariement alliée à l'hydrolyse de l'ATP transforme MutS α/β en anneau glissant le long de la double-hélice. Plusieurs complexes MutS α/β sont chargés pour un seul mésappariement, et diffusent le long de l'ADN ce qui permet ensuite le recrutement de l'hétérodimère MutL α (MLH1-PMS2) [Erie & Weninger, 2014]. Ce complexe, activé par PCNA, va inciser l'ADN sur le brin lésé de chaque côté du mésappariement, puis recruter soit l'exonucléase EXO1 (5' \rightarrow 3') soit, l'endonucléase Rad27 (chez la levure, appelée FEN1 chez les mammifères, mais chez qui ce processus n'a pas encore été vérifié) [Calil *et al.*, 2021]. EXO1 va éliminer une section d'ADN, souvent de plusieurs de centaines de paires de bases, contenant le mésappariement [Erie & Weninger, 2014; Hsieh & Zhang, 2017]. La section d'ADN simple brin résultante va immédiatement être stabilisée et protégée par les protéines RPA. Enfin, l'ADN est resynthétisé par les polymérases δ/ϵ , comme pour une réplication initiale et reliqué par la ligase I après EXO1 [Hsieh & Zhang, 2017]. Lorsque c'est Rad27 qui est recruté, la polymérase δ (seule) resynthétise le brin endommagé en déplaçant l'ancien, qui est ensuite clivé par Rad27 [Calil *et al.*, 2021]. Une troisième voie du MMR, elle aussi fortement dépendante de MutS α mais indépendante d'EXO1 et Rad27, et impliquant un grand nombre d'incision de l'ADN semble exister également, mais étant nettement moins bien caractérisée, elle ne sera pas discutée ici [Calil *et al.*, 2021]. Il est également à noter que le glissement des anneaux MutS α/β ne fait pas encore consensus et que certains modèles proposent que le complexe reste à l'endroit où il a été chargé [Hsieh & Zhang, 2017].

2. Réparation par excision de nucléotides

La réparation par excision de nucléotides (NER) permet de réparer les lésions volumineuses qui distordent la structure de la double hélice. Ce genre de dommages, dont les principaux représentants sont les dimères de pyrimidines cyclobutyliques (CPD – *Cyclobutane Pyrimidine Dimers* ; ~75 %, Figure 5) et les photoproduits 6,4-pyrimidine-pyrimidone (6,4-PP ; ~25 %, Figure 5) (mais peuvent également inclure d'autres modifications de l'ADN) [Bukowska & Karwowski, 2018], sont généralement induits par la lumière ultraviolette ou les polluants environnementaux. Le NER se découpe en deux sous-voies, qui diffèrent par leur mode de reconnaissance du dommage : le NER couplé à la transcription (TC-NER – *Transcription-Coupled NER* ; aussi appelé réparation couplée à la transcription (TCR – *Transcription-Coupled DNA Repair*)) détecte le blocage de l'ARN pol II ; alors que le NER sur génome entier (GG-NER – *Global Genome NER*) détecte directement la lésion et non le blocage de la polymérase. Passés les premières étapes, les deux voies fusionnent lors du recrutement du complexe TFIIH (Figure 6) [Bukowska & Karwowski, 2018].

Dans le cas du TC-NER (Figure 6), c'est la détection du blocage de l'ARN pol II par CSB (*Cockayne Syndrome B*) qui initie la réparation. Par la suite, CSB va recruter CSA (*Cockayne Syndrome A*), qui à son tour permet le recrutement de UVSSA (*UV-Stimulated Scaffold Protein A*). Le complexe CSA/UVSSA est stabilisé par CSB, ce qui permet enfin le recrutement du facteur de transcription TFIIH [van den Heuvel *et al.*, 2021]. Jusqu'à récemment on pensait que l'ARN pol II était reculée par TFIIH afin de permettre l'incision de du dommage [Bukowska et Karwowski, 2018], mais il semblerait que la polymérase soit en fait complètement dissociée de l'ADN lors du TC-NER [Chiou *et al.* 2018].

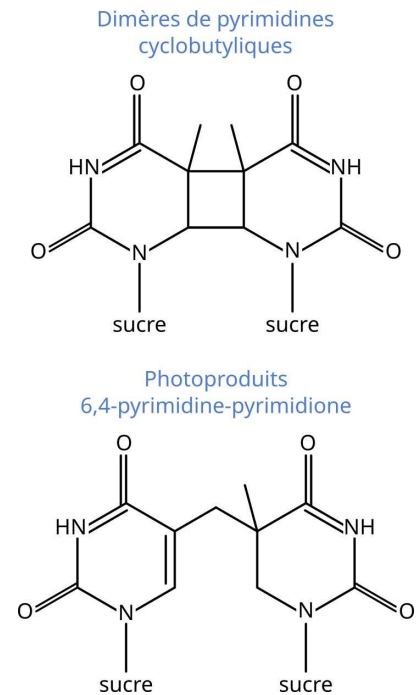


Figure 5: Dimères de pyrimidine.

Le GG-NER est initié par la reconnaissance du dommage et de la perturbation de la structure de l'ADN résultante par le complexe composé de XPC (Xeroderma pigmentosum groupe C), HR23B (*Human Rad23 homolog B*) et de la Centrine 2, éventuellement aidé de UV-DDB dans le cas de lésions peu distordantes [Bukowska & Karwowski, 2018 ; D'Souza *et al.*, 2022]. XPC recrute ensuite TFIIH, et c'est ici que les deux sous-voies du NER se rejoignent. Les deux sous-unités de TFIIH XPB

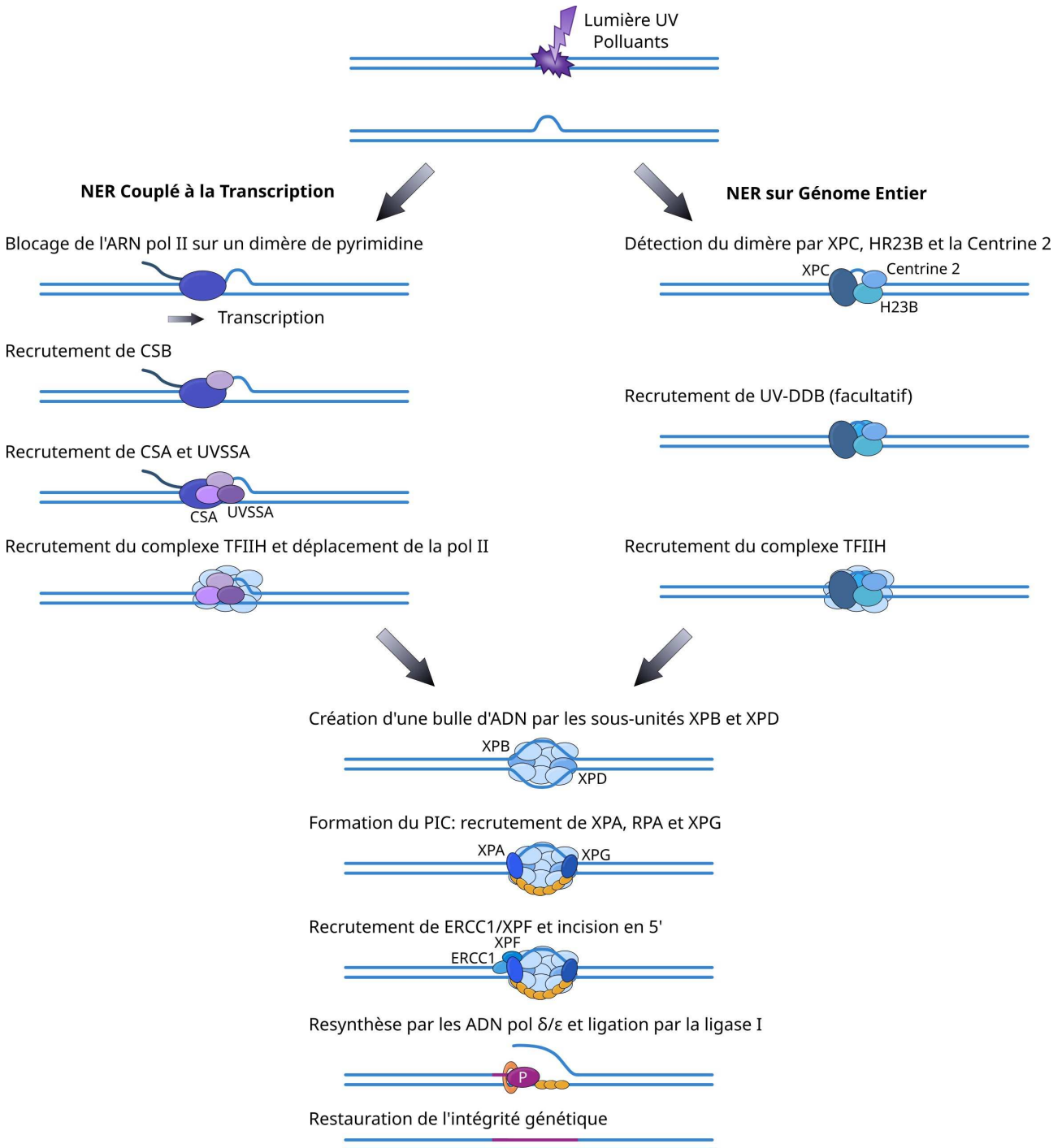


Figure 6: Réparation par Excision de Nucléotide, couplée à la transcription ou sur génome entier. P : polymérase.

et XPD ouvrent l'ADN grâce à leurs activités hélicases afin de créer une bulle propice à la réparation [Bukowska & Karwowski, 2018 ; D'Souza *et al.*, 2022]. Lorsque XPD est bloqué sur la lésion, il permet le recrutement des facteurs du complexe de pré-incision (PIC – *Pre-Incision Complex*) : XPA, RPA et XPG. L'ordre dans lequel XPA et RPA sont recrutés n'est pas tout à fait clair, mais il semble certain que XPG permet le déplacement de XPC et la formation du PIC [D'Souza *et al.*, 2022]. Par la suite, XPA recrute l'endonucléase ERCC1/XPF qui incise l'ADN en 5'. Il semblerait que la synthèse d'ADN par les ADN pol $\delta/\kappa/\epsilon$ (stabilisées par PCNA) soit effectuée avant l'incision en 3' par XPG [D'Souza *et al.*, 2022]. Enfin, le complexe ADN ligase III/XRCC1 ou la ligase I scelle le nouveau brin à l'ancien, ce qui termine le processus [Bukowska & Karwowski, 2018].

3. Réparation par excision de base

Les modifications de bases, généralement dues à une oxydation ou alkylation de l'ADN sont prises en charge par la réparation par excision de base (BER – *Base Excision Repair*). Cette voie de réparation est initiée par le recrutement d'une ADN-glycosylase, spécifique à un ou quelques types de lésions. A ce jour, 11 ont été découvertes chez les mammifères (Tableau 2) [Saparbaev & Zharkov, 2017]. Elles sont regroupées en six grandes familles, mais trois d'entre elles englobent la majorité des ADN-glycosylases des mammifères [Krokan & Bjørås, 2013]. La première est la famille Hélice-coude-Hélice (HhH – *Helix hairpin Helix*) et est caractérisée par un domaine de liaison à l'ADN HhH et un motif Gly/Pro-riche suivi d'un Asp (motif GPD) ; l'Asp étant le résidu catalytique. La seconde famille est la famille Fpg/Nei ou H2TH, dont le domaine de liaison à l'ADN est un domaine Hélice-2-tours-Hélice (H2TH), et qui contient également un sandwich β et une longue hélice α dans son domaine N-terminal (N-ter) dont l'extrémité est le groupe catalytique. Enfin, la troisième famille, UDG-like, comprend les glycosylases organisées autour d'un feuillet β situé entre deux hélices α [Saparbaev & Zharkov, 2017].

Les ADN-glycosylases peuvent être monofonctionnelles ou bifonctionnelles (Tableau 2). Les ADN-glycosylases monofonctionnelles ne clivent que la base modifiée en attaquant le lien *N*-glycosylique entre la base et le désoxyribose, laissant un site apurinique/apyrimidique (AP). En revanche, *in vitro*, les ADN-glycosylases bifonctionnelles sont également capables de prendre en charge le site AP généré par l'activité *N*-glycosylase et de couper le lien phosphodiester entre deux nucléotides grâce à leur activité endonucléase, créant ainsi un trou d'un nucléotide [Fortini *et al.*, 1999]. Cependant, les extrémités d'ADN laissées par les ADN-glycosylases bifonctionnelles doivent être nettoyées afin de permettre la resynthèse d'ADN. Dans le cas des ADN-glycosylases de la famille HhH, cette étape est effectuée par l'AP-endonucléase 1 (APE1) ; tandis que pour les protéines

NEIL (famille H2TH), c'est PNK (polynucléotide kinase) qui prend le relai [Wiederhold *et al.*, 2004 ; Das *et al.*, 2006] ; ces deux familles ayant des modes d'action différents, générant donc des extrémités chimiquement différentes. De plus, toutes les ADN-glycosylases connues, quel que soit l'organisme, et quelle que soit la famille à laquelle elles appartiennent, détectent la lésion dont elles ont la charge en insérant un AA possédant un cycle aromatique dans la double hélice, servant ainsi de senseur [Banerjee *et al.*, 2005 ; Dunn *et al.*, 2011]. Une fois la lésion trouvée, elle est extrudée dans le site catalytique, permettant son excision. L'universalité de ce mécanisme souligne son importance.

Tableau 2: ADN glycosylases présentes chez les mammifères

ADN Glycosylase (famille)	Type	Substrats	Structures de l'ADN reconnues	Références
AAG/MPG (Tag-like)	Mono-fonctionnelle	ϵ A; 3-meA; 7-meG; 3-meG; hypoxanthine	ADN double-brin (de préférence face à un T)	Chakravarti <i>et al.</i> , 1991 ; Dosanjh <i>et al.</i> , 1994 ; Abner <i>et al.</i> , 2001
UNG (UDG-like)	Mono-fonctionnelle	ss U; U:G; U:A	ADN simple ou double-brin	Slupphaug <i>et al.</i> , 1995
SMUG1 (UDG-like)	Mono-fonctionnelle	U ; 5-hmU ; 5-hoU ; 5-fU	ADN simple ou double-brin	Haushalter <i>et al.</i> , 1999 ; Boorstein <i>et al.</i> , 2001 ; Masaoka <i>et al.</i> , 2003
TDG (UDG-like)	Mono-fonctionnelle	T:G; T:meG; U:G	ADN double-brin (îlots CpG)	Neddermann & Jiricny, 1993 ; Neddermann <i>et al.</i> , 1996
MBD4 (HhH)	Mono-fonctionnelle	T:G; U:G	ADN double-brin (îlots CpG)	Hendrich & Bird, 1998 ; Hendrich <i>et al.</i> , 1999
MUTYH (HhH)	Mono-fonctionnelle	A:8-oxoG	ADN double-brin	Slupska <i>et al.</i> , 1996 ; Takao <i>et al.</i> , 1999

ADN Glycosylase (famille)	Type	Substrats	Structures de l'ADN reconnues	Références
OGG1 (HhH)	Bifonctionnelle	8-oxoG:C ; FapyG:C	ADN double-brin	<i>Bjorås et al., 1997 ; Radicella et al., 1997 ; Roldán-Arjona et al., 1997 ; Rosenquist et al., 1997</i>
NTH1 (HhH)	Bifonctionnelle	TG ; urée ; 5-hoC ; 5-hoU ; ds 5,6-DHU ; FapyG	ADN double-brin	<i>Hilbert et al., 1997 ; Ikeda et al., 1998</i>
NEIL1 (H2TH)	Bifonctionnelle	FapyA ; FapyG ; TG ; urée ; 5-hoC ; 5-hoU ; T:C ; U:C	Bulles, Fourches, ADN simple et double-brin	<i>Hazra et al., 2002 ; Bandaru et al., 2002 ; Dou et al., 2003 ; Hazra & Mitra, 2006</i>
NEIL2 (H2TH)	Bifonctionnelle	5-hoU ; 5,6-DHU ; 8-oxoG	Bulles, Fourches	<i>Hazra et al., 2002 ; Dou, et al., 2003 ; Hazra & Mitra 2006</i>
NEIL3 (H2TH)	Bifonctionnelle	ss Sp ; ss Gh ; ss DHT ; ss MeFapyG ; ss TG ; ss 5-hoU ; Sp:C ; Gh:C ; MeFapyG:C	Bulles, Fourches, ADN simple et double-brin	<i>Liu et al. 2010</i>

Le BER se subdivise en deux sous-voies, la voie courte (sp-BER – *short-patch BER*) qui permet le remplacement d'un seul nucléotide, et la voie longue (lp-BER – *long-patch BER*) qui excise et remplace 2 à 8 nucléotides. L'emprunt d'une voie plutôt que l'autre est dicté par l'ADN-glycosylase recrutée, et donc dans une certaine limite, par le type de lésion [Fortini *et al.*, 1999], mais également par l'étape du cycle cellulaire. En effet, les ADN-glycosylase monofonctionnelles semblent pouvoir initier les deux voies, mais les ADN-glycosylases bifonctionnelles (en particulier OGG1 et

NTH1) engage préférentiellement le sp-BER (Figure 7) [Saparbaev & Zharkov, 2017]. De plus, si le sp-BER semble être actif tout au long du cycle, le lp-BER serait plutôt mis en œuvre durant ou après la réplication [Fortini & Dogliotti 2007 ; Krokan & Bjørås, 2013]. Le BER engagé par les NEIL rejoint préférentiellement le sp-BER une fois le site AP incisé par PNK [Wiederhorld *et al.*, 2004 ; Das *et al.*, 2006].

Le sp-BER est relativement simple et se déroule en quatre étapes principales. Tout d'abord, la base modifiée est reconnue et excisée par l'ADN-glycosylase correspondante, générant un site AP. XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*), une protéine d'échafaudage essentielle au bon déroulement du BER, est recrutée par l'ADN-glycosylase, et sert de point d'ancrage à tous les facteurs de réparation suivants. Malgré le fait que les ADN-glycosylases initiant le sp-BER soient bifonctionnelles, en cellules de mammifères, il a été montré que c'était APE1 qui prenait en charge les sites AP après l'excision de la base endommagée par OGG1 [Hill *et al.*, 2001 ; Vidal *et al.*, 2001] et NTH1 [Marenstein *et al.*, 2003]. Par la suite, l'incision du site AP par APE1 laisse un trou d'un nucléotide, également reconnu comme cassure simple-brin (SSB – *Single-Strand Break*), et comblé par l'ADN pol β . Enfin, le nouveau nucléotide incorporé est scellé au reste du brin par la ligase III (Figure 7) [Fortini & Dogliotti, 2007]. Durant tout le processus, la lésion et les intermédiaires

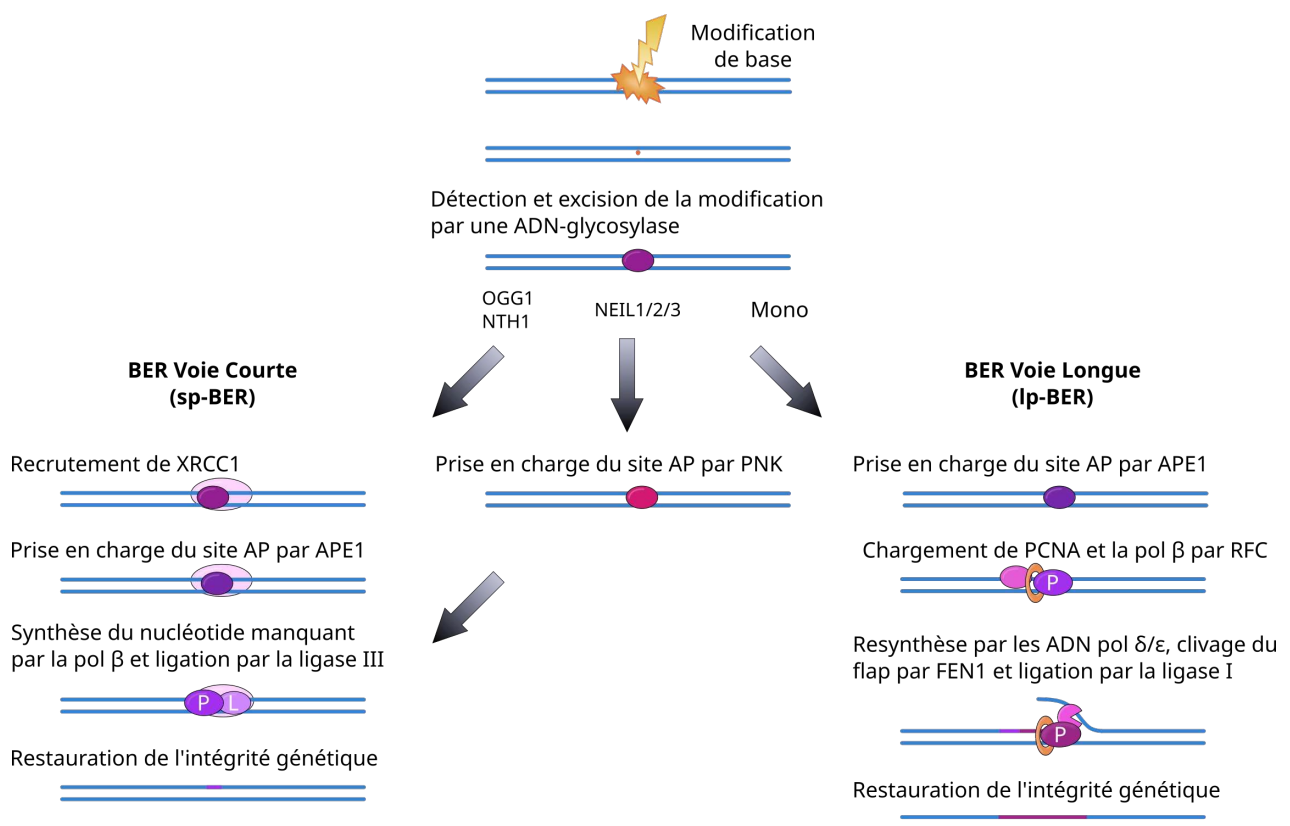


Figure 7 : Réparation par Excision de Base. P : polymérase, L : ligase.

de réparation ne sont jamais laissés seuls. Les protéines de réparation sont déplacées les unes après les autres par les suivantes, afin de protéger l'ADN et éviter des conséquences plus graves (dégradation par les endonucléases, cassures (simple ou double-brin), remaniements chromosomiques, etc.) [Wilson & Kunkel, 2000 ; Prasad *et al.*, 2010].

Le lp-BER est quant à lui plus complexe, comprenant plus d'étapes et impliquant plus de protéines. Les premières étapes sont similaires au sp-BER : la lésion est reconnue et excisée par l'ADN-glycosylase et le site AP résultant est pris en charge par APE1. C'est à cet endroit que les deux voies divergent. Le facteur de réplication C (RFC – *Replication Factor C*) permet de charger PCNA, nécessaire à l'ADN pol β qui amorce la synthèse de réparation. Le reste de la synthèse est effectué par les ADN pol répliquatives δ/ϵ , générant ainsi un flap d'ADN, libéré par FEN1 (*Flap Endonuclease 1*). Enfin, la ligase I permet la ligation à l'ancien brin (Figure 7) [Fortini & Doglitti, 2007 ; Abbotts & Wilson, 2017].

D'autres protéines peuvent également intervenir dans le BER, telles que la poly(ADP-ribose) (PAR) polymérase 1 (PARP1) qui permet l'ajout de chaînes de PAR autour de la zone de dommages, principalement sur elle-même, et les protéines environnantes (majoritairement les histones). La PARylation induit la relaxation de la chromatine permettant l'accès aux protéines de réparation [Lebeaupin *et al.*, 2015 ; Sellou *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017]. Si cette voie de signalisation est plutôt liée à la réparation des cassures simple-brin (que l'on détaillera dans le prochain paragraphe), elle peut également avoir lieu durant le BER, en particulier lorsque ce dernier se déroule en hétérochromatine ou dans les télomères [Lan *et al.*, 2014 ; Fouquerel *et al.*, 2019], mais elle n'est pas indispensable [Campalans *et al.*, 2013 ; Lan *et al.*, 2014]. L'une des principales protéines à être recrutées via la PARylation est XRCC1, cependant, son recrutement peut être PAR-indépendant dans le cas du BER [Campalans *et al.*, 2013].

4. Réparation des cassures simple-brin

Comme évoqué précédemment, les cassures simple-brin (SSB) peuvent être un intermédiaire de réparation du BER, généré par l'excision du site AP. A ce titre, la voie de réparation des SSB (SSBR – *SSB Repair*) est parfois considérée comme une sous-voie du BER [Abbotts & Wilson, 2017]. Cependant, les SSB peuvent également survenir indépendamment du BER, suite à un stress oxydant ou par l'action des topoisomérases I [Caldecott 2008, 2014 ; Abbotts & Wilson, 2017], ce qui implique de pouvoir les détecter. La présence des cassures est signalée par le recrutement de PARP1, l'un des premiers facteurs à intervenir lors de l'apparition d'une SSB. La relaxation chromatinienn

induite par la PARylation va permettre le recrutement et l'accès à la zone de dommages aux protéines de réparation. De même que pour le BER, XRCC1 va être rapidement recrutée, mais cette fois-ci grâce à la PARylation, et servir de protéine d'ancrage pour les facteurs de réparation suivants. Lorsque les extrémités de la cassure sont chimiquement endommagées (c'est-à-dire autres que 3'-OH et 5'-phosphate), elles doivent être restaurées afin de permettre la resynthèse d'ADN. C'est le rôle de différentes protéines telles qu'APE1, FEN1, PNK, etc. en fonction du type de dommage de l'extrémité concernée [Caldecott, 2008]. La suite du mécanisme est identique au BER, soit à la voie courte dans le cas où un seul nucléotide est à remplacer, soit à la voie longue lorsque plusieurs sont manquants [Caldecott, 2008].

5. Réparation des cassures double-brin

Les cassures double-brin (DSB – *Double Strand Break*) sont particulièrement délétères, car si elles ne sont pas prises en charge rapidement, elles peuvent mener à des réarrangements chromosomiques et/ou à la perte de matériel génétique, et ainsi générer une forte instabilité génétique [Venkatesan *et al.*, 2015 ; Cannan & Pederson, 2016]. Dans les cas extrêmes, une suraccumulation de DSB peut induire la mort cellulaire par apoptose. Comme mentionné précédemment, elles peuvent résulter de l'action des topoisomérases de type II [Pommier *et al.*, 2022]

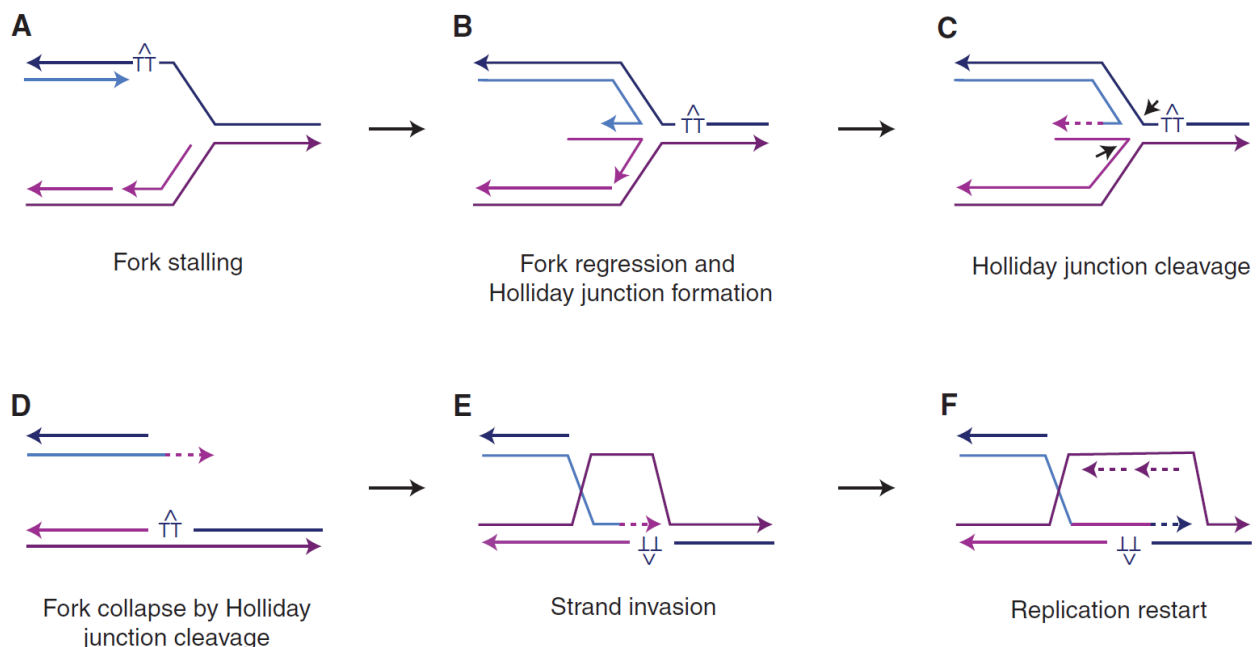


Figure 8: Induction d'une DSB suite à l'effondrement d'une fourche de réplication. A. La polymérase est bloquée par un dommage, la fourche s'arrête. B. La fourche régresse et forme une jonction de Holliday. C. La jonction de Holliday est clivée par les résolvases (flèches noires), D. résultant en une DSB. E. La cassure est réparée par HR et F. la réplication repart. Les pointes de flèches indiquent l'extrémité 3'. Mehta & Haber, 2014.

ou survenir lors d'un blocage et effondrement d'une fourche de réplication qui nécessite le clivage de la jonction de Holliday résultante et donc la formation d'une DSB (Figure 8) [Mehta & Haber, 2014], mais également être les conséquences d'une accumulation de SSB dans une même région du génome [Carusillo & Mussolino, 2020]. Enfin, elles peuvent être induites directement par les rayonnements ionisants ou par une exposition à certaines molécules chimiques [Cannan & Pederson, 2016].

De façon similaire aux SSB, les DSB doivent tout d'abord être détectées et signalées avant de pouvoir être réparées. C'est principalement le rôle de trois kinases de la famille des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) : les DNA-PKc (protéines kinases dépendantes de l'ADN), ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ATR (*ATM and Rad3 related protein*) qui vont être rapidement recrutées à la zone endommagée et phosphoryler une large gamme de substrats [Sirbu & Cortez, 2013]. Ces phosphorylations vont permettre d'une part de signaler la présence de la cassure, mais également de moduler la transcription [Ui *et al.*, 2020] et l'avancée du cycle cellulaire [Beishline & Azizkhan-Clifford, 2014], afin de permettre à la réparation d'avoir lieu. Entre autres, l'une des principales cibles d'ATM est la sérine 139 de l'histone H2AX [Burma *et al.*, 2001 ; Caron *et al.*, 2015], dont la forme phosphorylée, γ H2AX, est un important marqueur des DSB. Elle permet entre autre le recrutement d'autres protéines ATM qui vont elles aussi phosphoryler les histones H2AX environnantes, amplifiant ainsi le signal; ainsi que celui d'autres facteurs de réparations (détaillés ci-dessous) [Sirbu & Cortez, 2013 ; Vitor *et al.*, 2020].

Par la suite, les DSB sont réparées selon deux types de mécanismes, en fonction de l'étape du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule. Durant les phases S/G2 où les chromosomes sont en cours de réplication ou déjà répliqués, et donc durant lesquelles un modèle est disponible pour les mécanismes de réparation, les DSB sont principalement réparées par recombinaison homologue (HR – *Homologous Recombination*) (Figure 9) [Lebeaupin *et al.*, 2015 ; Scully *et al.*, 2019]. Pendant le reste du cycle, c'est la jonction de brins non-homologue (NHEJ – *Non-Homologous End Joining*) (Figure 9) qui est mise en œuvre [Lebeaupin *et al.*, 2015 ; Scully *et al.*, 2019]. Ces deux voies principales se subdivisent chacune en différentes sous-voies, mais seuls les mécanismes généraux seront détaillés ici.

Dans le cas de la HR, la recherche d'homologie et l'utilisation de la chromatide sœur comme modèle permet une réparation fidèle. Une résection assez importante (jusqu'à 300 nucléotides) des brins cassés est nécessaire afin de créer des sections d'ADN simple-brin en 3', et est effectuée par le complexe MRN/CtIP [Scully *et al.*, 2019]. Ce complexe sert également de plateforme pour le recrutement de la kinase ATM qui permet de signaler la présence du dommage. La section simple-

brin n'est pas laissée libre dans le nucléoplasme, mais est immédiatement couverte de protéines RPA afin de la protéger et de la stabiliser. RPA est ensuite déplacée par BRCA2 et remplacée par RAD51. Le filament nucléoprotéique RAD51 est très dynamique et permet la recherche d'homologie de séquence en envahissant la double-hélice d'ADN et en facilitant l'appariement des bases [Scully *et al.*, 2019]. Lorsqu'une homologie suffisante est trouvée, RAD51 est libéré de l'ADN qui est synthétisé, principalement par la pol δ , ou par l'une des polymérase spécifiques à la synthèse en présence de dommages (Figure 9).

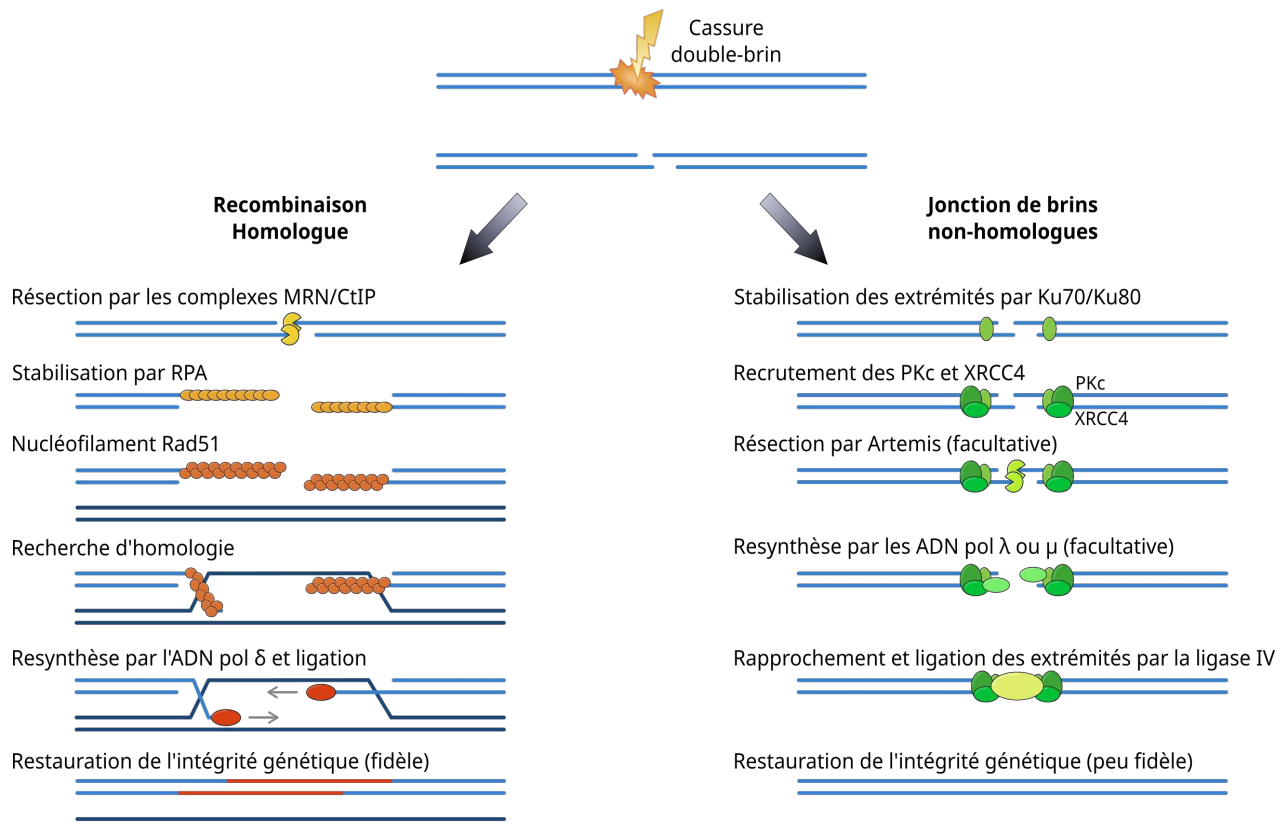


Figure 9: Principales voies de réparation des cassures double-brin, par recombinaison homologue ou jonction de brin non-homologue. D'après Lebeaupin *et al.*, 2015 et Scully *et al.*, 2019.

La réparation par NHEJ, à l'inverse, est considérée comme étant sujette aux erreurs. En effet, au lieu de chercher une séquence homologue comme modèle, cette voie de réparation ne fait que « recoller » les extrémités des brins d'ADN cassés. Le processus est initié par le recrutement de Ku70/Ku80 aux extrémités cassées des brins d'ADN qui permet le recrutement des facteurs de réparation suivants. Tout d'abord les sous-unités catalytiques des DNA-PKc, l'ADN ligase IV, la protéine d'ancrage XRCC4, vont permettre le rapprochement des deux extrémités d'ADN. Si besoin, ces dernières vont être légèrement résectionnées par la nucléase Artémis afin de permettre la ligation, effectuée par la ligase IV. Une synthèse peut également être nécessaire, en fonction de

l'ampleur de la résection, prise en charge par les polymérases spécialisées dans la synthèse translésion, λ et μ dans ce cas précis (Figure 9) [Scully *et al.*, 2019].

III. Quelles sont les conséquences d'un défaut de réparation de l'ADN ?

Un défaut de réparation de l'ADN peut avoir différentes conséquences au niveau génomique, dont certaines ont déjà été évoquées, généralement regroupées sous le terme de « mutation génétique ». Dans son sens le plus large, une mutation désigne tout changement de la séquence nucléotidique dans le génome d'une cellule, et maintenu lors de la division cellulaire [Bertram, 2000]. Elles peuvent aller d'une « simple » mutation ponctuelle, à de lourds réarrangements chromosomiques selon les cas [Généétique, 8e édition, chapitre 15, Pearson, par Klug, Cummings & Spencer], et peuvent avoir de lourdes conséquences sur l'organisme. Ainsi, un certain nombre de pathologies est associé à un défaut de réparation de l'ADN. L'un des états pathologiques les plus évidents lorsque l'on parle de dommages dans l'ADN et de défauts de réparation est bien entendu la survenue de cancers, ces derniers étant le résultat d'un processus progressif résultant de l'accumulation de mutations dans le génome menant à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et/ou à l'activation d'oncogènes [Bertram, 2000 ; Venkatesan *et al.*, 2015]. L'apparition de cancers n'est cependant pas la seule pathologie découlant d'une instabilité génétique, et l'accumulation de mutations au sein d'un organisme a aussi été associée à son vieillissement et à de nombreuses maladies liées au vieillissement, entre autres du fait de l'entrée en sénescence ou apoptose des cellules. [Campisi *et al.*, 2019 ; Vijg, 2021].

1. Mutations ponctuelles et petits indels

Les mutations ponctuelles, aussi appelées mutations par substitution, sont généralement issues d'erreurs de réplication, liées ou non à un appariement erroné suite à une modification de bases.

a. Les mutations synonymes

Les mutations ponctuelles ont souvent un impact limité sur la séquence protéique traduite grâce à la redondance du code génétique. Dans ce cas-là, la mutation est considérée comme synonyme. Cependant, il a été montré que le même acide aminé (AA) n'était pas nécessairement incorporé avec la même efficacité par le ribosome selon le codon en jeu, ce qui pouvait mener à un

ralentissement de la traduction, à des altérations de repliement de la protéine en cours de traduction [Rauscher & Ignatova, 2018], ou à un risque plus élevé d'incorporation du mauvais AA [Sauna & Kimchi-Sarfaty, 2011]. Au niveau de l'ARNm, certaines mutations synonymes peuvent mener à des défauts d'épissage ou altérer sa stabilité [Sauna & Kimchi-Sarfaty, 2011]. Ces mécanismes sont bien entendu soumis aux pressions de sélection, et ont mené au fil de l'évolution à l'utilisation préférentielle de certains codons plutôt que d'autres, phénomène appelé le « biais d'usage de codon » [Tarrant & von der Haar, 2014 ; Callens *et al.*, 2021]. Ces mutations, autrefois dites silencieuses ont en réalité un impact nettement plus important qu'initialement envisagé, et ont été retrouvées impliquées dans un grand nombre de maladies humaines [Sauna & Kimchi-Sarfaty, 2011]. C'est par exemple le cas de la protéine CTFR, dont le mutant CTFR(Δ F508) est très souvent retrouvé chez les patients atteints de la mucoviscidose. Ce mutant est causé par la délétion des trois nucléotides CTT, dont le C est le dernier du triplet ATC codant pour I507, et les TT sont les deux premiers nucléotides de celui codant pour F508. La conséquence de cette délétion est la formation d'un nouveau triplet ATT, codant lui aussi pour l'isoleucine. Toutefois, la traduction de cette protéine mutée est trop longue, induisant sa dégradation prématurée et donc des niveaux très bas de CTFR chez les patients atteints de mucoviscidose [Bartoszewski *et al.*, 2010 ; Shah *et al.*, 2015]. En cellules, restaurer le codon ATC en maintenant la délétion F508 augmente très fortement le taux d'expression de CTFR, permettant ainsi la production d'une protéine fonctionnelle malgré le Δ F508, témoignant donc de l'impact de la mutation synonyme [Bartoszewski *et al.*, 2010 ; Shah *et al.*, 2015].

b. Les mutations faux-sens

Une mutation ponctuelle peut également générer un triplet codant pour un AA différent ; elle est alors qualifiée de faux-sens. Ces mutations peuvent avoir des conséquences très différentes selon quel est le nouvel AA par rapport à l'original et où il se trouve dans la protéine. Ainsi, la stabilité de la protéine peut être altérée en cas de perte de ponts disulfures, si la charge électrique est différente ou si le nouvel AA induit des collisions stériques. Ces effets sont particulièrement observés lorsque le résidu en question se trouve à l'intérieur de la protéine, ce qui laisse peu de place pour accommoder les chaînes latérales des AA environnants. De fait, il a été montré que les AA se trouvant à l'intérieur des protéines étaient soumis à de plus fortes pressions de sélection et étaient donc plus conservés que ceux résidant à la surface [Conant & Stadler 2009]. Toutefois, une mutation à la surface de la protéine n'est pas nécessairement neutre non plus, car elle peut modifier sa capacité à recevoir des modifications post-traductionnelles ou perturber des potentielles interactions protéines-protéines [Yates & Sternberg, 2013].

De tels effets ne vont pas sans avoir de plus lourdes conséquences à l'échelle de l'organisme, et de nombreuses maladies humaines sont causées ou ont été reliées à des mutations faux-sens [Yue *et al.*, 2005 ; Yates & Sternberg, 2013]. De plus, différentes mutations ponctuelles situées dans le même gène peuvent avoir des effets différents, selon leur impact sur la protéine finale. C'est par exemple le cas de la protéine WASP qui est à l'origine de trois maladies différentes lorsqu'elle est mutée : le syndrome de Wiskott-Aldrich (déficit immunitaire liée au chromosome X), la thrombocytopénie liée à l'X (forme intermédiaire du syndrome de Wiskott-Aldrich) et la neutropénie liée à l'X (faible taux de neutrophiles). Des mutations faux-sens (R41G et E131K) dans le domaine d'interaction avec VASP induisent le syndrome de Wiskott-Aldrich ou la thrombocytopénie ; tandis que la neuropathie survient lorsque c'est le domaine d'interaction avec CDC42 qui est muté (I294T) [Wang *et al.*, 2012].

c. Les mutations non-sens

Enfin, une mutation ponctuelle peut mener à l'apparition d'un codon-stop ; il s'agit alors d'une mutation non-sens, générant une protéine tronquée [*Génétique 8ème édition, chapitre 15, Pearson, par Klug, Cummings & Spencer*]. Par conséquent, ces mutations ont tendance à produire des protéines peu ou pas fonctionnelles, selon l'emplacement de la mutation dans le gène. Un exemple très sévère de mutation non-sens est la mutation G44A dans le gène *NDUFS4*, qui code pour une sous-unité du complexe I de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. Cette substitution remplace un codon TTG (Trp) par un codon TAG (stop), induisant l'arrêt de la traduction après seulement 14 AA. La protéine résultante est par conséquent non fonctionnelle, et empêche l'assemblage du complexe I. Les patients portant cette mutation ne survivent que quelques mois après la naissance [Petruzzella & Papa, 2002].

d. Les petits indels

Les petits indels, provenant de dérapages de l'ADN polymérase lors de la réplication, sont parfois également considérés comme des mutations ponctuelles. Cependant, leurs conséquences au niveau génomiques sont différentes de celles des substitutions, puisqu'ils mènent souvent à un décalage du cadre de lecture, à moins d'être en multiple de 3. En dehors de ce cas particulier où quelques AA sont ajoutés ou supprimés dans une séquence en AA autrement conservée par rapport à la version sauvage, la mutation va complètement modifier la séquence en AA et fait généralement apparaître un codon-stop prématuré ou, à l'inverse, disparaître celui d'origine [Bertram, 2000 ; Mullaney *et al.*, 2010]. Ici encore, les conséquences sur l'organisme sont souvent assez sévères,

les protéines résultantes étant rarement fonctionnelles. En effet, même dans le cas d'indels ne perturbant pas le cadre de lecture, l'ajout ou la suppression d'AA est à risque de déstabiliser la structure de la protéine, ou d'interférer dans ses interactions avec d'autres protéines. C'est le cas du gène EGRF (*Epidemial Growth Factor Receptor*) qui est très souvent retrouvé muté dans différents cancers humains, en particulier celui du poumon [Sigismund *et al.*, 2018 ; Harrison *et al.*, 2020 ; Remon *et al.*, 2020]. En plus de mutations par substitution et autres indels, ce gène présente la délétion de 3 AA (Δ LRE) dans l'exon 19 dans 44 % des cas de cancers où il est muté [Gazdar, 2009]. Ces délétions suractivent la protéine en favorisant un changement de conformation vers la forme catalytiquement active et en la stabilisant dans cette conformation, ce qui favorise la survie et la prolifération cellulaire [Tamirat *et al.*, 2019].

2. Réarrangements chromosomiques

Les réarrangements chromosomiques sont souvent les conséquences d'une forte exposition à des rayonnements ionisants ou agents chimiques, menant à de multiples cassures double-brin [Venkatesan *et al.*, 2015 ; Cannan & Pederson, 2016]. Les extrémités d'ADN sont alors reliées, mais pas nécessairement dans le bon ordre ou au bon endroit, ce qui peut donner lieu à des translocations de portions de chromosomes sur un autre, ou des inversions, insertions/délétions de grands segments du génome, et, dans les cas extrêmes, à des chromosomes acentriques (absence de centromère) ou dicentriques (présence de deux centromères) (Figure 10). Les cellules comportant des chromosomes dicentriques n'étant pas capables de se diviser correctement, elles ont tendance à disparaître dans les mois ou années suivant l'exposition aux rayonnements [Ramalho *et al.*, 1995]. Les chromosomes acentriques sont quant à eux perdus lors de la mitose, l'attachement au fuseau mitotique aux chromosomes étant impossible en l'absence de centromères. En revanche, les translocations, ou grands indels n'empêchent pas la mitose, et, de fait, les cellules en présentant sont maintenues dans l'organisme.

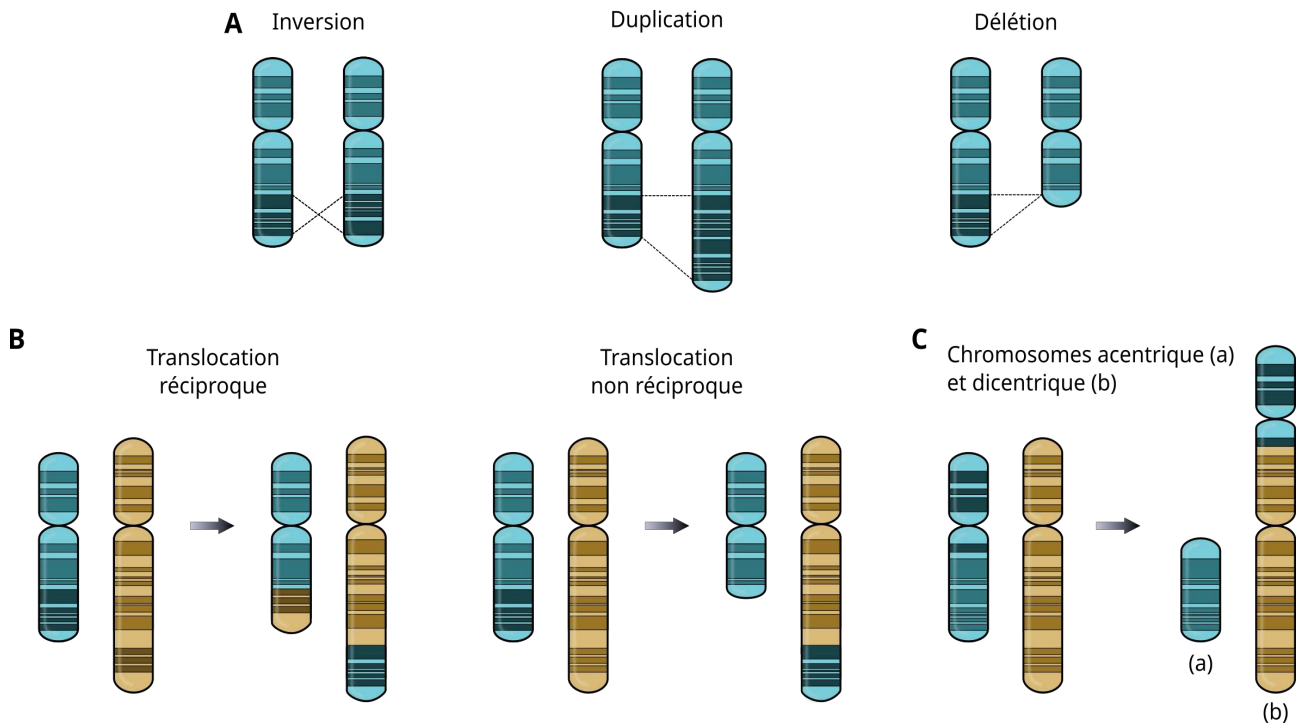


Figure 10: Réarrangements chromosomiques. **A.** Réarrangements impliquant un seul chromosome. **B.** Translocations (réarrangements impliquant deux chromosomes). La translocation réciproque n'induit pas de perte de matériel génétique, alors que c'est le cas de la translocation non réciproque. **C.** Cas particulier de translocation non réciproque induisant un chromosome acentrique (a) et un chromosome dicentrique (b).

Par ailleurs, ces réarrangements chromosomiques sont susceptibles de mettre à proximité des gènes ou régions régulatrices qui étaient initialement très éloignés, ce qui peut générer des protéines de fusion dans le cas où deux régions codantes se retrouvent l'une à la suite de l'autre ; ou à l'extinction ou activation de gènes si leurs régions régulatrices et/ou codantes changent d'environnement génomique [Bertram, 2000 ; Mitelman *et al.*, 2007]. Ces processus sont souvent à l'origine de la carcinogenèse, comme c'est le cas pour le lymphome de Burkitt, qui est généralement dû à une translocation qui impacte d'une part la section q24 du chromosome 8 où se situe le gène *MYC*, et d'autre part les régions 14q32, 2p11 ou 22q11, où se trouvent respectivement les gènes *IGH*, *IGK* et *IGL*, tous codant pour une immunoglobuline [Mitelman *et al.*, 2007]. *MYC*, codant pour un facteur de transcription (TF – *Transcription Factor*) dont la propre transcription et l'activité sont normalement finement régulées, devient alors constitutivement actif, du fait des éléments de régulation des gènes des immunoglobulines. Cette surexpression induit une prolifération cellulaire incontrôlée, permettant le développement cancéreux [Stine *et al.*, 2015].

3. Conséquences au niveau cellulaire

Les mutations peuvent avoir des effets délétères sur le fonctionnement cellulaire, même lorsqu'elles apparaissent en dehors des régions codantes des gènes. En effet, la modification de séquences régulatrices de la transcription peut perturber l'activation ou la répression des gènes concernés, en empêchant ou induisant par exemple la liaison des facteurs de transcription aux régions promotrices [Siametis *et al.*, 2021]. De même, une mutation au sein d'îlots CpG, enrichis dans les régions promotrices des gènes, risque de modifier le paysage épigénétique local [Bertram, 2000]. En particulier, des mutations amenant à l'activation de gènes régulant le cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN peuvent avoir des conséquences dramatiques en permettant l'échappement au contrôle du cycle cellulaire et mener à l'apparition de cancers [Matthews *et al.*, 2022].

Ainsi, au niveau cellulaire, l'apparition de dommages dans l'ADN va avoir plusieurs conséquences. D'une part, la cellule va mobiliser les mécanismes de réparation décrits plus haut afin

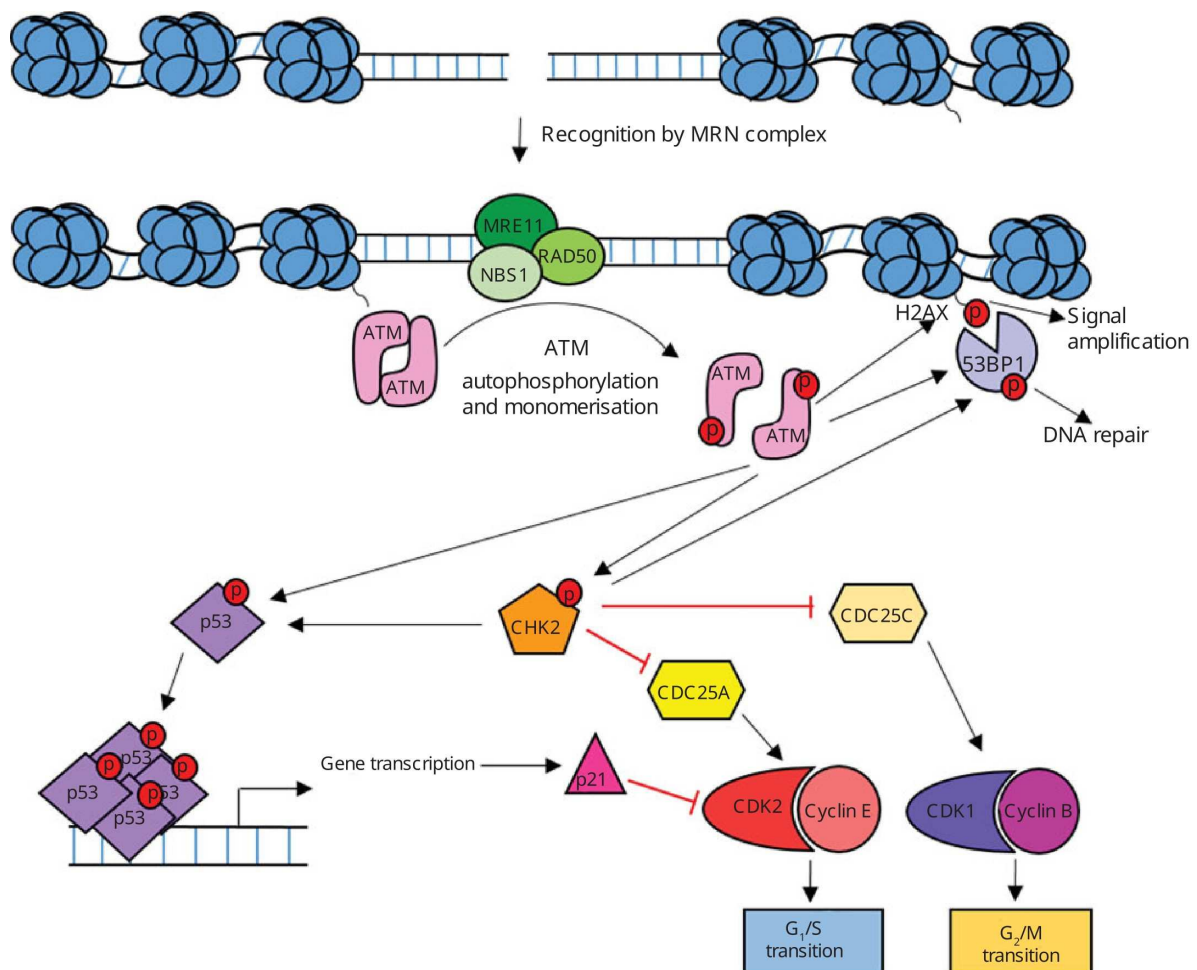


Figure 11: Cascade de réactions permettant la mise en œuvre des checkpoints G1/S et G2/M. Smith *et al.*, 2020.

de réparer les dommages. Si cela n'est pas suffisant, que trop de dommages sont détectés ou perdurent pendant trop longtemps, deux checkpoints spécifiques (G1/S et G2/M, Figure 11) permettent de suspendre voire arrêter le cycle cellulaire afin d'éviter qu'un matériel génétique endommagé ne soit transmis à la génération de cellules suivantes [Smith *et al.*, 2020]. Le checkpoint G1/S bloque l'entrée en phase S si des dommages sont détectés, tandis que le G2/M empêche le passage en mitose si la cellule subit un stress répliatif [Matthews *et al.*, 2022]. Ils sont fortement dépendants de kinases impliquées dans la détection des dommages, telles qu'ATM, ATR, ou les DNA-PKc (Figure 11). Elles sont activées par leur recrutement à la zone de dommages, ce qui va leur permettre de phosphoryler CHK1 et CHK2, p53 et γ H2AX qui permettent la transduction de signal en aval de la cascade [Smith *et al.*, 2020]. A leur tour, CHK1 et CHK2 phosphorylent leurs cibles, à savoir majoritairement CDC25A et CDC25C, ce qui induit leur inactivation et dégradation, puis l'arrêt du cycle. En effet, le rôle de ces phosphatases est de déphosphoryler les kinases CDK2 et CDK1, permettant ainsi l'entrée en phases S et M, respectivement (Figure 11) [Smith *et al.*, 2020 ; Matthews *et al.*, 2021]. De même, une fois phosphorylé, p53 active p21, un inhibiteur des complexes CDK-cyclines, renforçant le blocage de l'entrée en phase S. p53 est également un TF induisant la transcription de gènes pro-apoptotiques, ce qui mène à la mort cellulaire par apoptose si le stress perdure pendant trop longtemps [Smith *et al.*, 2020]. De plus, lors du checkpoint G2/M, la dégradation des CDC25 est induite par CHK1, qui phosphoryle une autre kinase, WEE1, qui phosphoryle à son tour CDK1, ce qui l'inhibe, et bloque l'entrée en mitose (Figure 11) [Schmidt *et al.*, 2017 ; Matthews *et al.*, 2021]. Il est à noter que les inhibitions/activations de ces enzymes sont à double sens, et donc qu'elles se régulent mutuellement. Ainsi, le passage ou non d'un checkpoint dépend de l'état d'équilibre entre les facteurs favorisant l'avancée du cycle et ceux l'en empêchant.

Par ailleurs, afin de lutter contre ces conséquences néfastes, la présence d'un trop grand nombre de dommages dans l'ADN, en particulier de DSB, peut également mener à l'entrée en sénescence de la cellule [Hernandez-Segura *et al.*, 2018 ; Carusillo & Mussolino, 2020]. La sénescence est un état particulier et irréversible marqué par l'arrêt définitif du cycle cellulaire. Différents types de sénescence existent, ayant différentes origines, mais un certain nombre d'entre eux est lié directement ou indirectement à la présence de dommages dans l'ADN ou d'agents à risque de l'endommager [Hernandez-Segura *et al.*, 2018]. Les cellules sénescents sont principalement caractérisées par une résistance à l'apoptose, une activation constitutive des voies de réparation avec notamment la présence de foci de γ H2AX, un métabolisme perturbé (quoiqu'actif), un grand nombre de mitochondries dysfonctionnelles (à l'origine d'une production de ROS accrue) et un défaut de repliement des protéines du système endo-membranaire [Hernandez-Segura *et al.*, 2018]. Si la

sénescence et les dysfonctionnements cellulaires qui l'accompagnent sont l'un des marqueurs du vieillissement les plus connus, c'est également une forme de protection contre l'apparition de cancers, de par l'incapacité des cellules à se diviser et la prise en charge des cellules concernées par le système immunitaire, permettant ainsi la dégradation des cellules endommagées et la régénération du tissu [Muñoz-Espín & Serrano, 2014 ; Hernandez-Segura *et al.*, 2018].

IV. Conclusion du chapitre

Durant ce chapitre, nous avons pu voir que les risques d'endommager l'ADN sont nombreux et variés, liés au métabolisme cellulaire physiologique aussi bien que provenant d'agressions extérieures. L'importance des voies de réparation de l'ADN est illustrée par la diversité des états pathologiques découlant de leurs défauts de fonctionnement. Comprendre comment ces mécanismes sont orchestrés aux niveaux cellulaire et moléculaire est essentiel au développement de nouvelles thérapies, et la recherche dans ces domaines est très active.

Durant mes travaux de thèse, je me suis intéressée à la détection d'une forme oxydée de la guanine, la 8-oxoguanine, par l'ADN-glycosylase OGG1, qui initie la réparation par excision de base. Cette modification de base est particulièrement intéressante du fait de son abondance et de son rôle métabolique.

Chapitre II. 8-oxoguanine et OGG1 : lésion et protéine de réparation ou marque épigénétique et régulateur de la transcription ?

I. La 8-oxoguanine, une lésion particulière

1. Abondance et conséquences de la 8-oxoguanine au sein du génome nucléaire

Au cours de la partie précédente, nous avons vu que différentes lésions pouvaient survenir dans l'ADN lors d'un stress oxydant, et parmi celles-ci, des oxydations de bases. La plus fréquente d'entre toutes est la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG, °G). En effet, de par son faible potentiel oxydatif, le plus bas de toutes les bases de l'ADN (et de l'ARN), la guanine est la base la plus facilement oxydable, en 8-oxoG ou en 2,6-diamino-4-oxo-5-formamidopyrimidine (FapyG) [Hall *et al.*, 1996 ; Greenberg, 2012]. De plus, cette même étude a montré que les électrons peuvent glisser le long de la double hélice sur une distance allant jusqu'à 37Å, en particulier en présence d'une suite de guanines, et que la guanine en 5' de l'alignement a le plus de chance d'être oxydée [Hall *et al.*, 1996]. Quantifier le nombre de 8-oxoG présentes dans un génome est une tâche ardue, car les protocoles d'extraction ont tendance à oxyder l'ADN. On estime cependant qu'entre 1 000 (en conditions physiologiques) et 100 000 (dans certains cancers) 8-oxoG sont produites chaque jour dans une cellule de mammifère [Lindahl & Barnes, 2000 ; Markkanen, 2017].

La 8-oxoG ne diffère d'une guanine normale que par deux atomes : un oxygène additionnel à la place d'un hydrogène sur le carbone 8, et un hydrogène à la place d'une paire d'électrons sur l'azote 7 (Figure 12). Ces différences n'induisent pas de distorsions de la double-hélice, n'empêchant pas un appariement Watson-Crick avec la cytosine [Lipscomb *et al.*, 1995]. La présence de la 8-oxoG au sein du génome ne bloque pas non plus les polymérase répliquatives ou transcriptionnelles, même si un

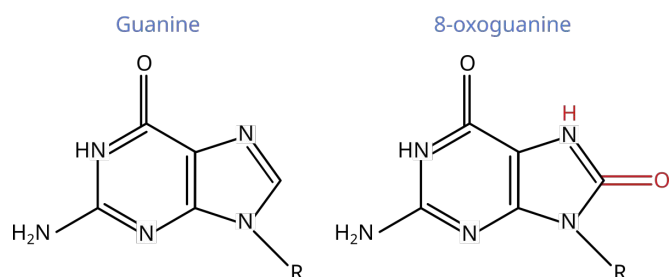


Figure 12: Différences entre la guanine (à gauche) et la 8-oxoguanine (à droite).

ralentissement a pu être constaté [Kitsera *et al.*, 2011]. A première vue, la 8-oxoG semble donc être une modification de base pour le moins insignifiante. Elle est pourtant très mutagène de par son appariement préférentiel à l'adénine en conformation *syn-anti* plutôt qu'à la cytosine, formant ainsi une paire Hoogsteen (Figure 13) [Kouchakdjian *et al.*, 1991]. En l'absence d'une réparation avant la réplication, la 8-oxoG a donc toutes les chances d'être appariée à une adénine, qui sera elle-même appariée à une thymine au cycle suivant, conduisant ainsi à une transversion G:C vers T:A [Shibutani *et al.*, 1991], une mutation fréquemment retrouvée dans les cancers [Alexandrov *et al.*, 2013]. De fait, inactiver les gènes responsables de la réparation de la 8-oxoG (décrits dans la prochaine partie) chez des souris a été relié à une augmentation du taux de cancers [Nakabeppu, 2014 ; Boiteux *et al.*, 2017].

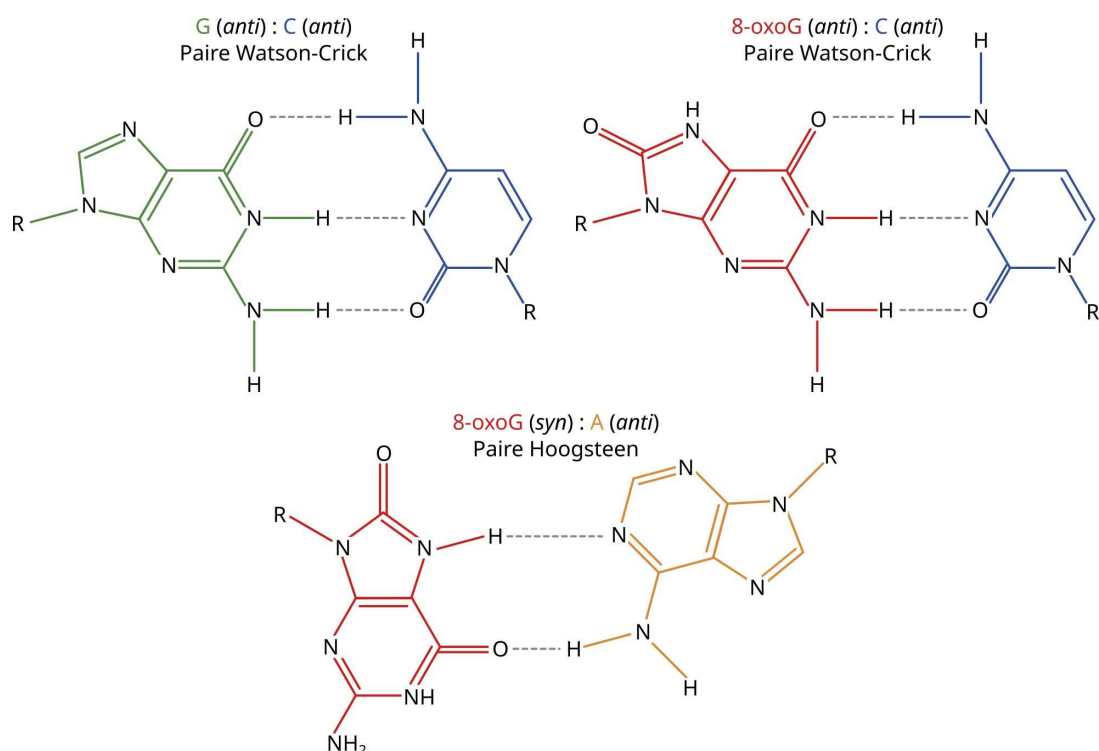


Figure 13: Appariements possibles entre la guanine et la cytosine (en haut à gauche), entre la 8-oxoguanine et la cytosine (en haut à droite), et entre la 8-oxoguanine et l'adénine (en bas).

D'autre part, la 8-oxoG a été impliquée dans l'instabilité des télomères [Fouquerel *et al.*, 2019]. Ils sont généralement associés au vieillissement du fait de leur raccourcissement progressif au fur et à mesure des cycles, induisant l'entrée en sénescence des cellules et limitant ainsi le risque de développer des cancers de par l'accumulation de mutations [Shay, 2018]. Toutefois, ce sont également des régions du génome particulièrement sensibles à l'oxydation du fait de la répétition riche en guanine ((TTAGGG)_n chez l'homme) dont ils sont constitués [Shay, 2018], le triplet de

guanine facilitant donc son oxydation [Hall *et al.*, 1996]. En cellules, la présence de niveaux élevés de 8-oxoG dans les télomères a été reliée à plusieurs dysfonctionnements [Fouquerel *et al.*, 2019 ; Barnes *et al.*, 2022]. En effet, il a été montré qu'un stress oxydant chronique induisait la perte accélérée des télomères, menant par la suite à la fusion de chromosomes, cassures et instabilité génomique [Fouquerel *et al.*, 2019] ; alors qu'à l'inverse, un stress oxydant aigu suffit à activer les kinases ATM/ATR et leurs cibles, celles-ci incluant p53 et p21, menant ainsi à l'entrée en sénescence prématurée des cellules [Barnes *et al.*, 2022].

Au niveau de l'organisme de nombreux états pathologiques ont été liés à de forts taux de 8-oxoG (indépendamment ou non des stress télomériques), souvent considérés comme un marqueur du vieillissement et des maladies associées [Radak *et al.*, 2011], telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer [Abolhassani *et al.*, 2017], Parkinson [Nakabeppu *et al.*, 2007]), les cancers [Nakabeppu, 2014 ; Boiteux *et al.*, 2017], ou les états inflammatoires [Ba *et al.* 2014b]. Toutefois, ces processus impliquant également les mécanismes de réparation de la 8-oxoG, ils seront discutés plus en avant dans la prochaine partie.

2. Prévenir l'accumulation de 8-oxoG dans le génome : le système GO

Étant donné l'étendue des conséquences délétères de la présence de 8-oxoG dans le génome, il est essentiel de pouvoir la détecter et la réparer. Pour cela, la cellule s'appuie sur un système basé sur trois enzymes : le système GO (Figure 14). La 8-oxoG appariée à la cytosine est réparée par la voie courte du BER, initiée par l'ADN-glycosylase OGG1 [Fortini & Dogliotti, 2007 ; Boiteux *et al.*, 2017], première enzyme du système GO, et qui sera présentée plus en détail plus loin. Cependant, il est important que la cellule puisse également reconnaître et exciser une adénine incorporée face à une 8-oxoG lors de la réplication, afin de prévenir la fixation des mutations G:C vers T:A. Dans ce cas-ci, c'est MUTYH (*MutY Homolog*), une autre ADN-glycosylase, capable de reconnaître le mésappariement 8-oxoG:A durant la réplication et d'exciser l'adénine, qui initie la voie longue du BER [Boiteux *et al.*, 2017 ; Markkanen, 2017]. Pour ce faire, MUTHY interagit directement et fonctionnellement avec les acteurs de la réplication et du MMR [Nakabeppu *et al.*, 2017]. Si la nouvelle base incorporée face à la 8-oxoG est encore une adénine, un nouveau cycle est initié par MUTYH, et ainsi de suite jusqu'à l'incorporation correcte d'une cytosine face à la 8-oxoG [Boiteux *et al.*, 2017]. Une fois la cytosine incorporée, c'est au tour d'OGG1 d'être engagée, afin de réparer la lésion.

Enfin, le réservoir de nucléotides, qui peut lui aussi être oxydé, doit pouvoir être nettoyé. En effet, l'incorporation d'un 8-oxo-dGTP (8-oxo-déoxyguanosine triphosphate) face à une adénine dans le brin en cours de synthèse est à risque de provoquer une mutation par transversion A:T vers C:G, à l'inverse de l'oxydation de la guanine d'une paire de bases G:C [Markkanen, 2017]. L'enzyme responsable du nettoyage du réservoir de nucléotides est l'hydrolase MTH1. Elle permet l'hydrolyse du 8-oxo-dGTP en 8-oxo-dGDP ou 8-oxo-dGMP (déoxyguanosine di/monophosphate,

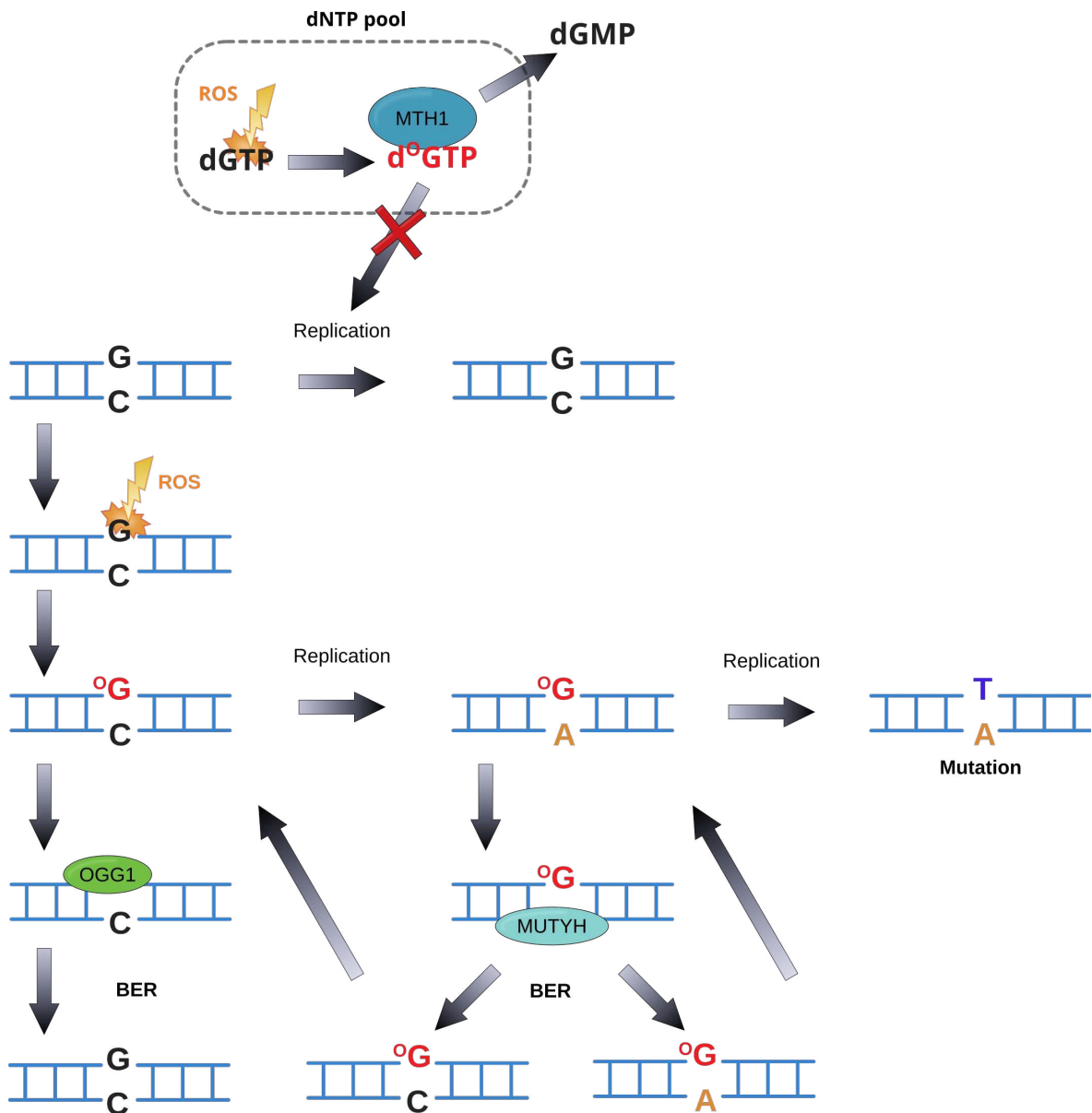


Figure 14: Représentation schématique du Système GO chez les Eucaryotes. Le réservoir de nucléotides est nettoyé par MTH1, limitant ainsi l'incorporation de 8-oxo-dGTP (d°G) dans le génome lors de la réplication. Lors de l'induction de 8-oxoG (°G) dans le génome, elle est prise en charge par OGG1. Si elle n'est pas détectée à temps et que la réplication induit un appariement de la 8-oxoG avec une A, alors MUTYH prend en charge l'adénine incorporée.

respectivement). Le 8-oxo-dGDP peut être rephosphorylé par les guanylate kinase [Markkanen, 2017], ce qui nécessite une nouvelle hydrolyse de la part de MTH1, mais ce n'est pas le cas du 8-oxo-dGMP, qui ne peut pas non plus être incorporé dans l'ADN lors de la réplication [Markkanen, 2017 ; Nakabeppu *et al.*, 2017]. MTH1 est la principale enzyme responsable du nettoyage des 8-oxo-dGTP du réservoir de nucléotides, mais en cas de défaut de fonctionnement, trois autres enzymes, MTH2, MTH3 et NUDT5, peuvent prendre le relais [Markkanen, 2017].

II. L'ADN-glycosylase OGG1

La première ADN-glycosylase, UDG (*Uracile DNA-glycosylase*), fut découverte chez *Escherichia coli* en 1974 par Tomas Lindahl [Lindahl, 1974], qui a par ailleurs reçu le Prix Nobel de Chimie en 2015 pour ses travaux sur la réparation de l'ADN. Par la suite, une multitude d'autres ADN-glycosylases a été mise au jour, tout d'abord chez les procaryotes, puis chez les eucaryotes, en commençant par la levure, avant d'être identifiées chez les mammifères.

1. Découverte et clonage d'OGG1

a. Fpg, la 8-oxoguanine ADN-glycosylase procaryote

Avant d'être clonée chez les eucaryotes, l'homologue fonctionnel d'OGG1, la formamidopyrimidine (Fapy) ADN-glycosylase (Fpg, également appelée MutM) a été découverte en 1979 par Chetsanga et Lindahl chez *E. coli* pour son activité de Fapy ADN-glycosylase [Chetsanga & Lindahl, 1979]. Puis, au début des années 1990, l'équipe de Nishimura a trouvé une enzyme ayant une activité de 8-oxoG ADN-glycosylase, toujours chez *E. coli* [Chung *et al.*, 1991]. L'année suivante, le même groupe démontre que l'ADN-glycosylase qu'ils ont récemment découverte et Fpg, mise au jour 10 ans plus tôt, ne sont en fait qu'une seule et même enzyme [Tchou *et al.*, 1991]. Cette enzyme bifonctionnelle témoigne d'une forte activité ADN-glycosylase et AP-endonucléase pour la paire de bases 8-oxoG:C ou le site AP:C, incluant une reconnaissance spécifique de la base face à la lésion. Son activité enzymatique est ainsi particulièrement faible lorsque la base complémentaire est une adénine. Cette sélectivité évite d'exciser la 8-oxoG face à une adénine, ce qui accélérerait le processus mutagène inhérent à la présence de 8-oxoG [Tchou *et al.*, 1991 ; Castaing *et al.*, 1993].

Ces découvertes chez *E. coli* ont ouvert la voie à la caractérisation des premières ADN-glycosylases chez les eucaryotes, en commençant par UNG chez la levure en 1981 [Crosby *et al.*, 1981], puis chez les mammifères.

b. Clonage d'OGG1 chez les eucaryotes

L'homologue fonctionnel eucaryote de Fpg, OGG1, a tout d'abord été cloné chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [van der Kemp *et al.*, 2004 ; Nash *et al.*, 1997]. L'année suivante, le gène humain d'OGG1 a été caractérisé par cinq équipes différentes à quelques jours ou mois d'intervalle [Bjørås *et al.*, 1997 ; Lu *et al.*, 1997 ; Radicella *et al.*, 1997 ; Rosenquist *et al.*, 1997 ; Roldán-Arjona *et al.*, 1997]. Les deux protéines, Fpg et OGG1, n'appartiennent pas à la même famille d'ADN-glycosylases, Fpg faisant partie, comme son nom l'indique, de la famille Fpg/Nei (ou H2TH) et OGG1 de la famille HhH. Elles sont donc structurellement différentes, mais effectuent les mêmes tâches, avec des spécificités similaires, à défaut d'être tout à fait identiques [van der Kemp *et al.*, 1996]. En effet, OGG1 témoigne d'une très forte préférence pour les substrats 8-oxoG:C, alors que Fpg excise les FapyG:C à peu près aussi efficacement que la 8-oxoG:C [van der Kemp *et al.*, 1996 ; Radicella *et al.*, 1997]. OGG1 est malgré tout capable de cliver efficacement les FapyG:C. Les deux enzymes sont également capables de cliver le site AP résultant de leur activité *N*-glycosylase *in vitro*. En cellules de mammifères c'est cependant l'AP-endonucléase APE1 qui se charge des sites AP, son affinité pour des derniers étant beaucoup plus élevée que celle d'OGG1 [Hill *et al.*, 2001 ; Vidal *et al.*, 2001 ; Dalhus *et al.*, 2011].

Le gène humain est localisé sur le chromosome 3p25, et code pour une protéine de 345 acides aminés, d'un poids moléculaire de ~39 kDa [Radicella *et al.*, 1997]. Deux isoformes principaux existent, codés par le même gène et résultant d'un épissage alternatif : α -OGG1, l'isoforme nucléaire auquel je me suis intéressée durant ma thèse, également présent à la mitochondrie (qui contient également tous les facteurs de réparation du BER) ; et β -OGG1, adressé à la mitochondrie [Boiteux & Radicella, 2000], mais inactif [Hashiguchi *et al.*, 2004].

OGG1 a également été retrouvée chez les plantes, les insectes, et certaines bactéries comme *Clostridium acetobutylicum* qui possèdent une protéine OGG plutôt que Fpg. Cependant, certains eucaryotes comme *Ceenorhabditis elegans* ou *S. pombe* en sont dépourvus [Denver *et al.*, 2003].

2. Structure et Fonctionnement d'OGG1

a. Structure d'OGG1

La structure d'OGG1 a été élucidée très rapidement après sa découverte. La lysine catalytique 249 (tous les numéros d'acides aminés réfèrent à la protéine humaine, à moins que ce ne soit spécifié autrement) a été mutée en glutamine, entraînant une incapacité de clivage de la part d'OGG1 et donc une rétention prolongée sur la lésion, permettant ainsi sa cristallisation (Figure 15) [Bruner *et al.*, 2000]. Les extrémités non-structurées N- et C-terminales ont de plus été digérées, afin de permettre la cristallisation du cœur de la protéine, entre les AA 12 et 325 (sur 345). De même, les trois résidus 80-81-82 font partie d'une boucle non-structurée, et n'ont pas pu être cristallisés [Bruner *et al.*, 2000]. Comme mentionné dans la section et le chapitre précédents, OGG1 appartient à la famille des ADN-glycosylases HhH. Elle possède donc le domaine Hélice-coude-Hélice caractéristique de cette famille, ainsi que le motif GPD riche en glycines et prolines, suivi de l'acide aspartique conservé (Figure 15). Le motif HhH va de la sérine 232 à la leucine 259, tandis que le motif GPD s'étend entre les deux acides aspartiques 260 et 268. L'acide aspartique conservé et caractéristique de la famille HhH est le D268. En conjugaison avec la lysine 249 (qui fait donc partie du motif HhH), il permet le clivage de la 8-oxoG. OGG1 contient également un motif NNN (149-150-151), très conservé au sein des protéines OGG1 des différents organismes (Figures 15, 16), même s'il n'est pas considéré comme caractéristique de la famille HhH [Bruner *et al.*, 2000 ; Radom *et al.*, 2007]. Ce motif est supposé maintenir en place le complexe OGG1/ADN, mais très peu d'études se sont intéressées à sa fonction.

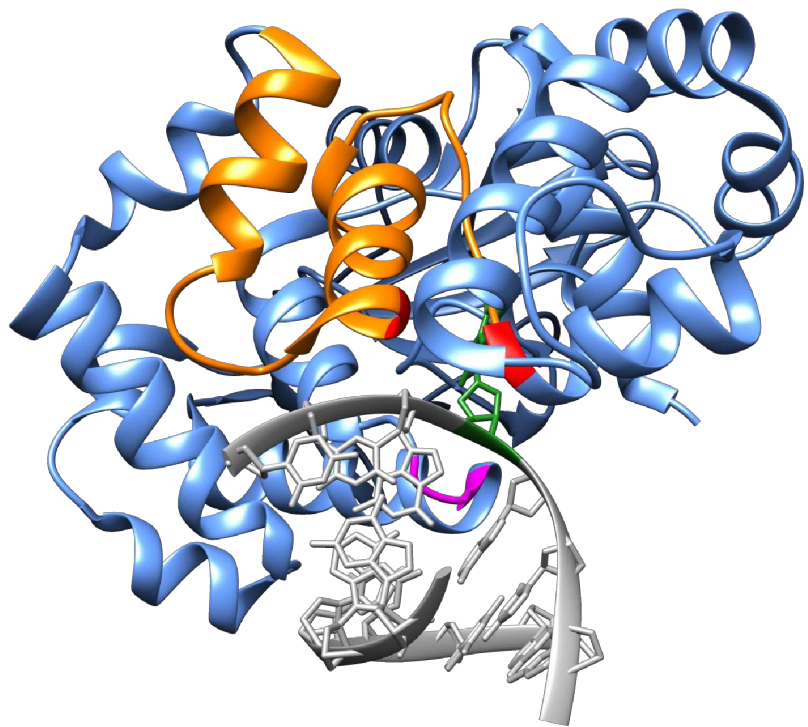


Figure 15: Structure d'OGG1. OGG1 est en bleu, l'ADN en gris. Le motif HhH-GPD est en orange, avec le K249Q et D268 en rouge ; le motif NNN est en magenta ; la 8-oxoG est en vert. PDB : 1EMB

HUMAN	103	DVTLAQLYH-	HWGSVDSHFQ	EVAQKFQGV	LLRQDPIECL	FSFICSSNNN	IARITGMVER
MOUSE	103	DVSLAQLYS-	HWASVDSHFQ	RVAQKFQGV	LLRQDPTECL	FSFICSSNNN	IARITGMVER
DROSO	104	DFDLKVN-QK	DWLSKDDNFV	KFL--SKPVR	LLSQEPFENI	FSFLCSQNNN	IKRISSMIEW
YEAST	90	DVSLKHLFDN	VWIPSDKAFA	KL--SPQGIR	ILAQEPWETL	ISFICSSNNN	ISRITRMCNS
CLOST	83	DRDYSVIK--	DELSKDVLK	QSIIEFGYGV	VLNQDPFEML	LSFIISARNN	IPSIKKTVNK

Figure 16: Alignement partiel des séquences d'OGG1 chez différents organismes. Les zones d'homologie sont sur fond gris, le motif NNN en rouge. CLOST = *Clostridium acetobutylicum*.

b. Reconnaissance et clivage de la 8-oxoguanine par OGG1

Le mécanisme de reconnaissance de la 8-oxoG et de discrimination des autres bases a été peu à peu dévoilé au fur et à mesure des différentes études structurales et biochimiques réalisées durant les deux dernières décennies [Bruner *et al.*, 2000 ; van der Kemp *et al.*, 2004 ; Banerjee *et al.*, 2005 ; Blainey *et al.*, 2006 ; Shigdel *et al.*, 2020 ; Wang *et al.*, 2021]. Le modèle actuel suppose donc qu'OGG1 scanne l'ADN à la recherche de 8-oxoG [Blainey *et al.*, 2006 ; Rowland *et al.*, 2014]. En effet, cette modification de base n'induisant pas de distorsion de la double hélice, et ne bloquant pas ou peu les polymérases, elle n'est pas détectée par les mécanismes de surveillance du génome liés à la réplication ou à la transcription, responsables de la détection de la majorité des dommages. OGG1 doit donc activement chercher chaque 8-oxoG afin de pouvoir la réparer, tâche ardue du fait du faible nombre de 8-oxoG présentes rapporté au nombre total de guanines normales. On estime ainsi qu'OGG1 doit pouvoir trouver deux ou trois 8-oxoG parmi des guanines non-oxydées environ un million de fois plus abondantes [Gedik & Collins, 2005 ; Ohno *et al.*, 2006].

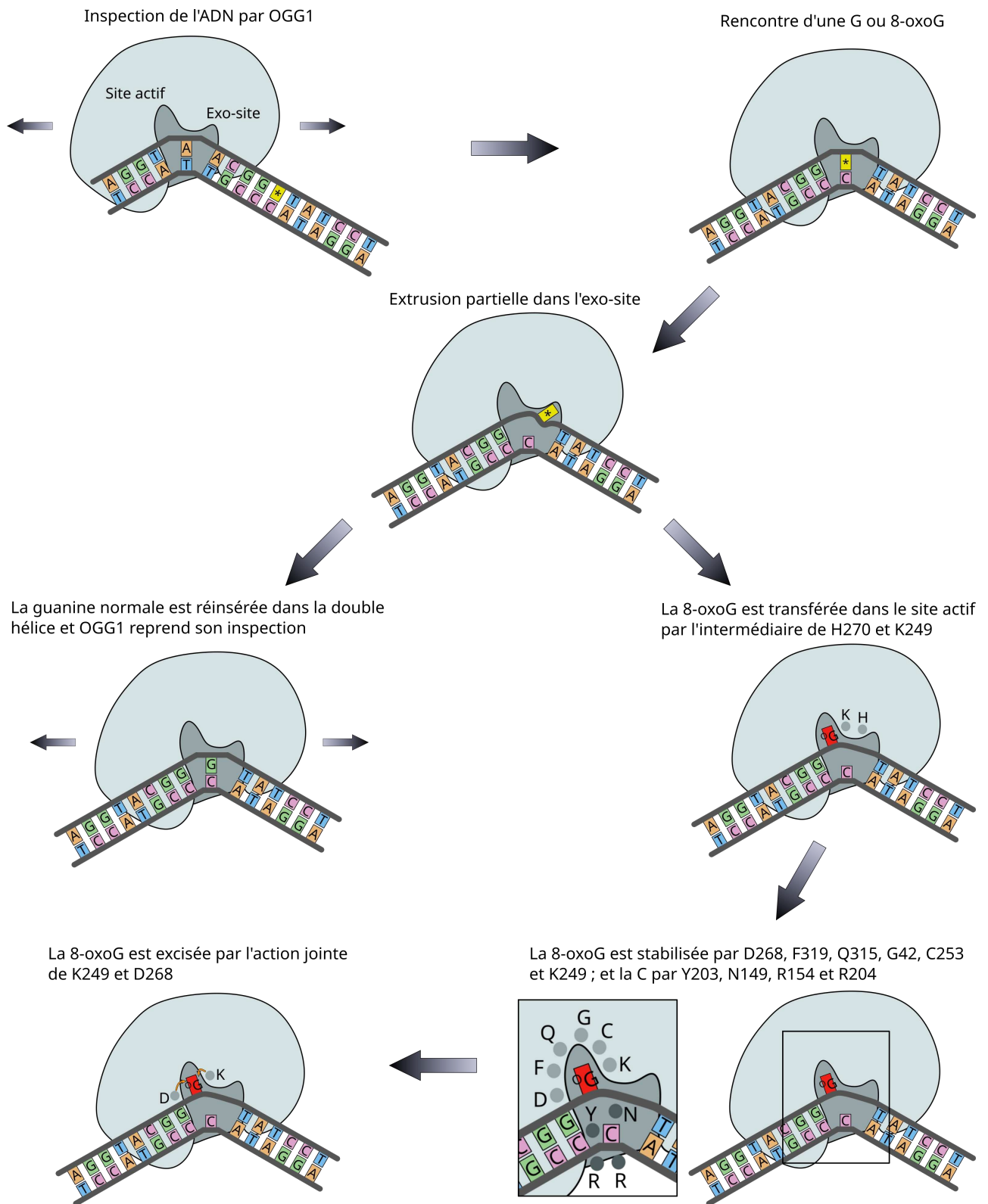


Figure 17: Modèle actuel du mécanisme de recherche et reconnaissance de la 8-oxoG (^oG) par OGG1. D'après Kuznetsova *et al.*, 2014 ; Shigdel *et al.*, 2020.

Afin de sonder l'ADN, OGG1 insère une tyrosine (Y203) dans la double hélice, ce qui lui permet de tester chaque paire de bases. Ce mécanisme semble être commun à toutes les ADN-glycosylases étudiées à ce jour [Banerjee *et al.*, 2005, 2006 ; Dunn *et al.*, 2011]. Durant cette phase de recherche, le résidu N149 peut créer une liaison hydrogène spécifique avec la guanine et la 8-oxoG dans sa conformation *anti* (mais pas en *syn*), ce qui lui permet d'assurer la spécificité pour la paire 8-oxoG:C [Shigdel *et al.*, 2020]. Cette étape permet donc d'éliminer les bases A, T et C, et la paire 8-oxoG:A. Il semblerait qu'ensuite la guanine et la 8-oxoG soient toutes les deux partiellement extrudées hors de la double hélice, dans un exo-site d'OGG1 situé à sa surface, un peu à l'extérieur du site catalytique (Figure 17) [Banerjee *et al.*, 2005 ; Shigdel *et al.*, 2020]. L'extrusion de la base (G ou 8-oxoG) serait facilitée par la courbure de 80° imposée à l'ADN par l'insertion de la tyrosine Y203 dans la double hélice [Banerjee *et al.*, 2005, 2006 ; Dunn *et al.*, 2011]. Cette extrusion partielle permettrait de vérifier l'état d'oxydation de la guanine. Si c'est une guanine normale, OGG1 ne peut pas la transférer dans son site catalytique, faute de pouvoir établir les contacts spécifiques nécessaires au transfert, et la compétition avec le processus de scan de l'ADN par OGG1 l'emporte : la guanine est réinsérée dans la double hélice, et OGG1 reprend son inspection de l'ADN (Figure 17). A l'inverse, si c'est une 8-oxoG, le résidu H270 d'OGG1 peut entrer en contact avec le C8=O, initiant le transfert de la base oxydée vers le site catalytique. H270 passe ensuite la main au résidu K249 qui permet l'alignement final de la 8-oxoG dans le site actif [Shigdel *et al.*, 2020], où elle est maintenue en place par différents acides aminés qui la prennent en sandwich : G42, C253, D268, Q315, F319 (Figures 17, 18). Durant ce processus, la courbure imposée à l'ADN est réduite à 70°, et non plus 80° [Banerjee *et al.*, 2005]. Une dernière vérification de l'état d'oxydation de la base est réalisée par le résidu G42, qui contacte directement l'hydrogène du N7, spécifique à la 8-oxoG [Bruner *et al.*, 2000]. L'attaque nucléophile conjointe des résidus

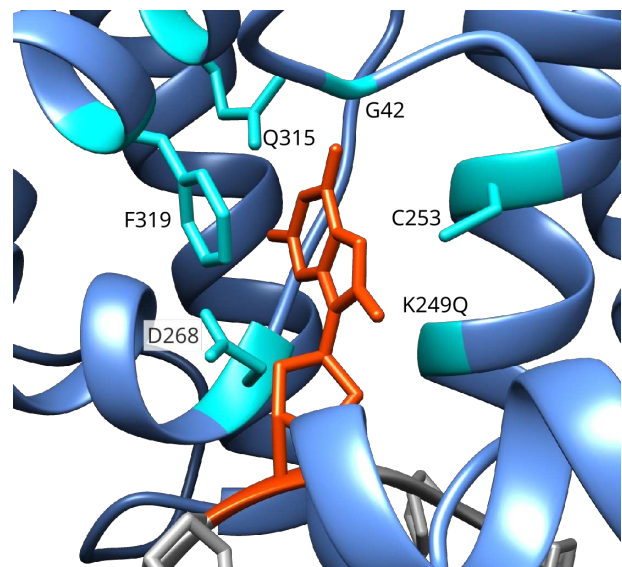


Figure 18: Structure du site actif d'OGG1 (bleu) lorsque la 8-oxoG (rouge) est extrudée. Le reste de l'ADN est en gris, les acides aminés notables et leurs chaînes latérales sont en cyan. Seule la chaîne latérale du Q249 n'est pas montrée puisqu'elle n'est pas pertinente, le résidu original étant une lysine. PDB : 1EMB.

K249 et D268 permet alors le clivage du lien *N*-glycosylique entre la base et le sucre, et l'excision de la base oxydée (Figure 17).

c. Reconnaissance de la cytosine

La reconnaissance de la cytosine face à la 8-oxoG, bien qu'essentielle au fonctionnement d'OGG1 et nécessaire pour éviter de renforcer l'effet mutagène de la 8-oxoG, a été beaucoup moins étudiée que le mécanisme de reconnaissance et d'excision de cette dernière. Le rôle clé de certains AA a toutefois été élucidé aux cours des années. Dès l'étude du laboratoire de Verdine en 2000, il a été constaté que les résidus N149, R154, Y203 et R204 contactaient directement la cytosine lorsque la 8-oxoG était extrudée, en particulier le N149 qui envahit le vide laissé par l'extrusion de la 8-oxoG (Figure 17). Ces interactions permettent d'une part de stabiliser la cytosine orpheline et le complexe OGG1/ADN, mais suggèrent également un rôle de ces résidus dans la spécificité d'OGG1 pour la paire 8-oxoG:C [Bruner *et al.*, 2000]. Cette même étude constatait que le mutant OGG1(R154H), retrouvé dans certains cancers humains, avait perdu la spécificité pour la paire 8-oxoG:C et pouvait exciser la 8-oxoG face à n'importe quelle base, même l'adénine, fortement exclue par la version WT [Bruner *et al.*, 2000]. De même, il a été montré que la protéine OGG de *Clostridium acetobutylicum* (CacOGG), qui présente naturellement un remplacement de l'équivalent des résidus R154 et Y203 par une méthionine et une phénylalanine, avait une spécificité décriée pour la paire 8-oxoG:C [Robey-Bond *et al.*, 2008]. Muter ces AA pour obtenir un mutant CacOGG(M132R/F179Y), équivalent donc à la protéine humaine, restaurait partiellement la spécificité pour la cytosine [Robey-Bond *et al.*, 2008]. L'implication des résidus R154 et R204 dans la reconnaissance de la cytosine a été confirmée par la suite, la cytosine étant la seule des quatre bases capable d'établir des liaisons hydrogène spécifiques avec ces deux arginines [Kuznetsova *et al.*, 2014].

3. Défauts de fonctionnement d'OGG1

a. OGG1 et cancers

Dès sa découverte en 1997, OGG1 a été associée à la survenue de cancers, en particulier aux cancers du poumon et du rein, du fait de la délétion fréquente de la région p25 du chromosome 3 (porteuse du gène *OGG1*) chez ces patients, [Lu *et al.*, 1997 ; Boiteux *et al.*, 2017]. De plus, plus de 200 mutations ponctuelles ont été retrouvées dans la région du gène *OGG1* (régions codantes et régulatrices), et plusieurs d'entre elles ont été associées à des cancers [Boiteux *et al.*, 2017]. Par exemple, la mutation R154H dans le site de reconnaissance de la cytosine mène OGG1 à « réparer »

la 8-oxoG:A, accélérant ainsi l'accumulation de mutations [Bruner *et al.*, 2000] et a été associée aux cancers gastriques et rénaux [Boiteux *et al.*, 2017] ; tandis que G12E bloque l'adressage mitochondrial [Audebert *et al.*, 2002]. Cependant, le variant d'OGG1 le plus étudié est S326C, du fait de sa remarquable fréquence dans les populations humaines : 13 à 38 % de la population caucasienne serait porteuse de ce polymorphisme, et jusqu'à 60 % dans les populations asiatiques [Morreall *et al.*, 2015]. Les individus porteurs de ce polymorphisme sont plus à risques de développer des cancers [Sugimura *et al.*, 1999 ; Elahi *et al.*, 2002]. En effet, selon les études il a été montré que ce variant d'OGG1 était deux à sept fois moins actif que la version sauvage [Kohno *et al.*, 1998 ; Dherin *et al.*, 1999 ; Bravard *et al.*, 2009]. De plus la C326 est oxydée en présence d'agents oxydants, rendant ce variant plus sensible au niveau redox de son environnement que le WT [Morreall *et al.*, 2015]. Par conséquent, le taux de réparation de la 8-oxoG est plus faible, menant donc fatalement à une mutagenèse accrue dans les cellules homozygotes pour ce variant. De plus, ce variant d'OGG1 est capable de dimériser, ce qui n'est pas le cas de la protéine sauvage, et impacterait son activité enzymatique [Hill & Evans 2006 ; Simonelli *et al.*, 2013].

b. OGG1 et les maladies neurodégénératives

En plus de son implication notoire dans les cancers, OGG1 est également impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer ou de Huntington. La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus fréquente. C'est une maladie liée au vieillissement et dont les causes sont encore assez mal comprises à l'heure actuelle. La maladie d'Alzheimer est la principale cause de démence [Goedert, 2015], et est caractérisée par des agrégats cérébraux anormaux, des plaques amyloïdes extracellulaires et inclusions intra-neuronales de la protéine Tau [Goedert, 2015]. De plus, des taux élevés de 8-oxoG ont été observés *post-mortem* dans des cerveaux de patients, aussi bien que chez des lignées de souris modèles pour la maladie d'Alzheimer [Abolhassani *et al.*, 2017]. Ce fait peut être corrélé à trois mutations d'OGG1 spécifiques à la maladie d'Alzheimer, la délétion de la cytosine 796 du gène générant une protéine tronquée et non fonctionnelle, et les deux substitutions A53T et A288V, menant là encore à des protéines à l'activité réduite. L'accumulation de 8-oxoG serait alors à l'origine d'un fort taux de mort cellulaire par apoptose : MUTYH, tentant de réparer les adénines incorporées à la place des cytosines face aux 8-oxoG générerait trop de SSB comme intermédiaires du BER, ce qui induirait le recrutement exagéré de PARP1. En PARylant son environnement à outrance, PARP1 dépriverait la cellule de tout son NAD⁺, déclenchant alors la mort par apoptose [Abolhassani *et al.*, 2017].

Toutefois, il n'y a pas pour l'instant de preuve que ces mutations d'OGG1 soient à l'origine de la maladie.

La maladie de Huntington quant à elle est une maladie autosomale dominante. La principale caractéristique de cette maladie est la chorée, un ensemble de mouvements involontaires et incontrôlables (qui lui vaut parfois le nom de chorée de Huntington), mais les symptômes fréquents incluent également des déficits moteurs et cognitifs, et parfois des troubles psychiatriques [Ayala-Peña, 2013]. La réparation de la 8-oxoG répétée et défectueuse du fait d'une mauvaise coordination des acteurs du BER initie des cycles d'oxydation/excision de la 8-oxoG qui mènent à l'expansion pathologique du triplet CAG dans le gène de la huntingtine [Kovtun *et al.*, 2007 ; Goula *et al.*, 2009, 2012]. La protéine résultante est peu stable, en particulier dans une région du cerveau bien spécifique, le striatum, impliquée entre autres dans la gestion des mouvements involontaires [Goula *et al.*, 2009 ; Ayala-Peña, 2013]. Ainsi, les souris *OGG1*^{-/-} sont moins susceptibles de développer la maladie de Huntington [Kovtun *et al.*, 2007 ; Budworth *et al.*, 2015].

III. Modulation de la transcription et réponse aux stress oxydants

1. Mise en évidence de l'implication d'OGG1 dans la régulation de la transcription

Si la 8-oxoG a d'abord été envisagée comme une lésion pré-mutagène à réparer du fait de ses conséquences délétères sur le génome et l'organisme, depuis une dizaine d'années elle est aussi de plus en plus considérée comme une marque épigénétique témoignant d'un stress oxydant [Seifermann & Epe, 2017 ; Ba & Boldogh, 2018]. Les régions pauvres en GC représentent environ 63 % du génome des cellules de mammifères, toutefois les régions riches en gènes sont également riches en GC, et plus particulièrement les promoteurs géniques dont ~70 % contiennent des îlots CpG. Ainsi, la facilité d'oxydation de la guanine en font le détecteur moléculaire de l'équilibre d'oxydo-réduction (redox) cellulaire idéal. La présence de 8-oxoG, en particulier dans les régions promotrices a été reliée dans de nombreux cas à une augmentation de la transcription des gènes associés, généralement via l'interaction de certains TF avec OGG1. C'est entre autres le cas pour un certain nombre de gènes impliqués dans la réponse aux stress oxydants ou dans les processus inflammatoires [Ba & Boldogh, 2018]. Ainsi, NF-κB, un TF connu pour être l'un des acteurs les plus importants dans les réponses à tous types de stress et les états inflammatoires, a été montré comme interagissant directement avec OGG1 [Ba *et al.*, 2014 ; Pan *et al.*, 2016] ; mais c'est également le cas

de TF plus généraux comme TFIID [Ba *et al.*, 2014a] ou le Médiateur de la transcription [Lebraud *et al.*, 2020]. Le lien entre la présence de 8-oxoG dans les promoteurs de gènes régulés par NF- κ B et la modification de l'expression des gènes en question a été soupçonné *in vitro* dès 2003 [Hailer-Morrison *et al.*, 2003], mais il aura fallu attendre 2014 pour avoir une preuve de l'interaction des deux protéines [Ba *et al.*, 2014a]. Depuis, l'implication d'OGG1 dans la régulation de l'expression de gènes contrôlée par plusieurs TF importants (*VEGF*, *AP-1*, *STAT1*) a également été démontrée [Zuchegna *et al.*, 2014 ; Pastukh *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2016 ; Makhdoumi *et al.*, 2019].

Le rôle d'OGG1 dans les processus inflammatoires a également été démontré *in vivo* en modèle murin. En effet, les souris *OGG1*^{-/-}, malgré des taux de 8-oxoG extrêmement élevés lors d'expositions à des agents oxydants et/ou inflammatoires, sont plus résistantes à l'inflammation résultante que les souris *OGG1*^{+/+} [Ba *et al.*, 2014b]. De même, des souris chez lesquelles un état inflammatoire a été induit par exposition au TNF- α , ont montré une réduction de la transcription des gènes impliqués dans l'inflammation lorsqu'on leur administrait un inhibiteur compétitif d'OGG1 [Visnes *et al.*, 2018]. Le TNF- α induit d'une part un stress oxydant, et d'autre part est un activateur de NF- κ B, impliqué dans la transcription des gènes inflammatoires. Ainsi, bloquer la reconnaissance de la 8-oxoG par OGG1 à l'aide d'un inhibiteur empêcherait sa liaison à l'ADN lésé, et bloquerait donc le recrutement OGG1-dépendant des TF impliqués dans la transcription des gènes inflammatoires [Visnes *et al.*, 2018], réduisant ainsi l'inflammation. Enfin, des études exposant des souris à des stress inflammatoires chroniques, par exposition à *Helicobacter pylori*, ou à des chocs induits par des endotoxines, ont montré que les souris *OGG1*^{-/-} présentaient respectivement moins de lésions gastriques [Touati *et al.*, 2006] ou des taux de cytokines et chimiokines [Mabley *et al.*, 2005] plus bas que les souris contrôles.

2. Mécanismes de régulation de la transcription via la 8-oxoG

Plusieurs mécanismes ont été évoqués pour expliquer l'implication de la 8-oxoG et d'OGG1 dans la régulation de la transcription en conditions oxydantes [Wang *et al.*, 2018].

Lors d'un stress oxydant, les guanines présentes dans les promoteurs (et ailleurs) vont être oxydées en 8-oxoG, ce qui va induire le recrutement d'OGG1 dans ces régions. Le premier modèle suggère que, OGG1 pouvant également être oxydée et donc temporairement inactive, mais capable de reconnaître la 8-oxoG, elle va rester piégée sur l'ADN [Ba & Boldogh, 2018 ; Wang *et al.*, 2018]. En conditions oxydantes, cela conduit à une accumulation d'OGG1 dans les zones riches en GC, à savoir un grand nombre de promoteurs. L'interaction entre OGG1 piégée sur les promoteurs enrichis

en 8-oxoG et différents TF semble alors capable d'induire une modulation de la transcription des gènes associés. De plus, cette résidence prolongée permet également d'induire localement une courbure d'approximativement 70° dans l'ADN, ce qui pourrait aussi favoriser l'initiation de la transcription [Travers, 1990 ; Wang *et al.*, 2018]. Ce mécanisme a été proposé comme pouvant être responsable de la régulation de gènes sous contrôle de NF- κ B [Ba & Boldogh, 2018]. Enfin, il a été montré qu'en conditions oxydantes prolongées, OGG1 pouvait recruter TET1, responsable de la déméthylation des cytosines, levant ainsi l'inhibition de la transcription de certains gènes [Zhou *et al.*, 2016]. A l'inverse, OGG1, en masquant les régions reconnues par certains TF, peut également réprimer la transcription de certains gènes. C'est par exemple le cas de CREB1 (*Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) Response Element Binding protein 1*), un TF extrêmement important, puisqu'il contrôle la transcription d'environ un quart des gènes chez les mammifères. Il reconnaît la séquence CRE (*cAMP Response Element* – 5'-TGACGTC-3') qui contient un îlot CpG (en rouge). Lorsque la guanine de cet îlot est oxydée en 8-oxoG, OGG1 est recrutée et sa présence empêche CREB1 de se lier à sa séquence consensus, ce qui bloque son recrutement, induisant une diminution de la transcription des gènes associés [Moore *et al.*, 2016].

Un second mécanisme impliquant OGG1 susceptible de réguler la transcription en conditions oxydantes fait intervenir son action enzymatique au niveau des séquences pouvant potentiellement former des G-quadruplex (G4), retrouvées dans un grand nombre de promoteurs [Fleming *et Burrows*, 2021]. Les G4 sont des structures particulières de l'ADN formées à partir de séquences contenant au moins quatre suites d'au moins trois G qui sont peu espacées entre elles. Une guanine de chacun des quatre lots se lie avec deux autres G en conformation Hoogsteen, de façon à former des tétrades plates, stabilisées par des ions K⁺ au centre (Figure 19) [Fleming & Burrows, 2021]. Deux modes de fonctionnement possibles ont été évoqués [Wang *et al.*, 2018]. Selon le premier, les guanines présentes dans les promoteurs possédant des séquences susceptibles de former des G4 vont être oxydées en 8-oxoG, induisant le recrutement d'OGG1 et l'initiation de la réparation, créant donc un site AP. La présence du site AP va déstabiliser le duplex, et induire la formation du G4. APE1 va alors se lier au site AP ainsi exposé, mais sans le cliver, permettant le recrutement de la

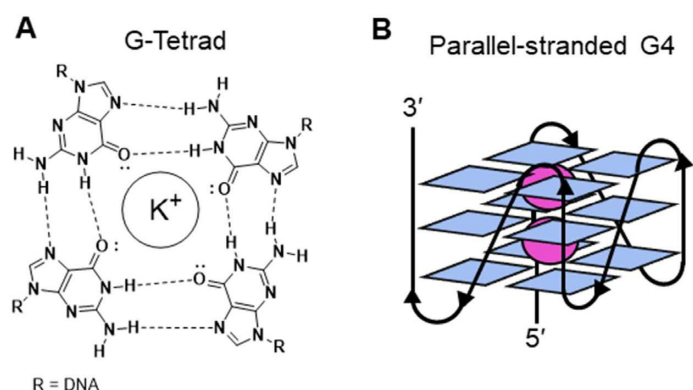


Figure 19: Structure des G-quadruplex. Adapté de Fleming & Burrows, 2021.

machinerie transcriptionnelle [Fleming *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2018]. Ce mode de fonctionnement a été caractérisé avec précision pour l'induction de la transcription de *VEGF* lors d'un stress hypoxique [Fleming *et al.*, 2017].

Toutefois, le mécanisme inverse a également été proposé pour certains gènes comme *KRAS* [Cogoi *et al.*, 2018 ; Wang *et al.*, 2018]. Dans ce cas-ci, le G4 est présent en l'absence de stress, inhibant la transcription du gène associé. L'oxydation des guanines qui le composent va permettre de recruter des TF spécifiques tels MAZ et hnRNP A1, qui vont déstabiliser le G4 et favoriser la reformation du duplex. OGG1 peut alors initier le BER, qui, une fois complété, permet la transcription de *KRAS* [Cogoi *et al.*, 2018].

Ainsi, différents mécanismes faisant intervenir la 8-oxoG et OGG1 permettent de réguler l'expression génique et de répondre efficacement à la survenue d'un stress oxydant.

IV. Conclusion du chapitre

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié les rôles d'OGG1 et de la 8-oxoG, beaucoup plus subtils et ambivalents que ce qui avait été imaginé de prime abord. Si la 8-oxoG est certes une lésion mutagène qu'il est important de pouvoir réparer de façon fiable afin d'éviter les états pathologiques, elle est également un marqueur de l'état d'oxydation de la cellule, et une marque épigénétique permettant de répondre à un stress oxydant, par l'intermédiaire d'OGG1. De même, cette enzyme n'est pas qu'une protéine de réparation, et son rôle en tant que régulateur de la transcription est de plus en plus avéré. La diversité des études montrant l'implication d'OGG1 dans de nombreux processus, physiologiques et pathologiques, témoigne de l'importance de cette protéine en tant que régulatrice de l'homéostasie de la cellule et de l'organisme.

Cependant, si son mode de fonctionnement commence à être plutôt bien compris grâce à toutes les études structurales et biochimiques publiées durant les 25 dernières années, une question subsiste : comment OGG1 trouve-t-elle la 8-oxoG au sein de l'environnement encombré du noyau et dans le contexte de la chromatine, sachant qu'en plus la 8-oxoG n'induit ni déformation de la double hélice, ni blocage des polymérases ?

Chapitre III. Comment une protéine trouve-t-elle sa cible au sein du noyau cellulaire ?

Le noyau cellulaire est un environnement très encombré, dont 30 % à 60 % de l'espace est occupé par la chromatine [López-Velázquez *et al.*, 1996 ; Rouquette *et al.*, 2009]. Dans la fraction restante, se trouvent diverses protéines. Cet encombrement pose un défi de taille aux protéines cherchant à interagir avec l'ADN.

I. Structure chromatinienne et diffusion

1. Les différents niveaux d'organisation de la chromatine

a. De l'ADN à la chromatine

Chaque cellule humaine contient près de deux mètres d'ADN nucléaire, à faire rentrer dans un noyau de quelques micromètres de diamètre. Pour réussir cet exploit, l'ADN est fortement compacté, enroulé autour de protéines bien particulières, les histones. Les histones de cœur sont organisés en hétérodimères : H2A et H2B (Histones 2A/2B) d'une part, et H3 et H4 (Histones 3/4) d'autre part. Deux dimères H3/H4 s'associent alors pour former un tétramère, auquel vont s'associer deux dimères H2A/H2B, créant ainsi un octamère d'histones autour duquel s'enroulent environ 147 paires de bases [Cutter & Hayes, 2015]. Cette structure forme le nucléosome (Figure 20) [Luger *et al.*, 1997], l'unité de base de la chromatine, le polymère formé de l'association de l'ADN et des histones et qui constitue le premier niveau de compaction de l'ADN. Les nucléosomes sont stabilisés au niveau du site d'entrée/sortie de l'ADN par l'histone de liaison H1 (Figure 20) [Thoma *et al.*, 1979] ; mais peuvent cependant glisser le long de l'ADN grâce à des remodeleurs chromatinien, permettant ainsi la régulation du niveau de compaction de la chromatine [Mueller-Planitz *et al.*, 2013]. De plus, l'association entre histones H1 détermine la structure locale de la chromatine en stabilisant le positionnement des nucléosomes [Luger *et al.*, 2012 ; Cutter & Hayes, 2015].

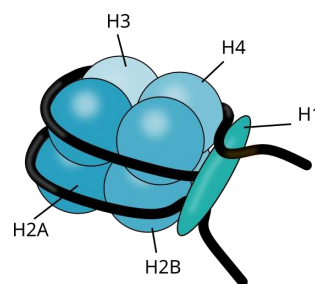


Figure 20: Structure d'un nucléosome. L'ADN est représenté en noir, les histones en bleu.

La chromatine est elle-même compactée en plusieurs niveaux d'organisation afin de répondre aux besoins des différents processus biologiques essentiels à la vie cellulaire (réplication,

transcription et réparation) (Figure 21) [Misteli, 2020]. Majoritairement d'après des études *in vitro*, il a longtemps été proposé que la chromatine s'organise en fibres de 10 et 30 nm de diamètre [Adkins *et al.*, 2004 ; Dehghani *et al.*, 2005]. Toutefois, des études plus récentes ont montré que la fibre de 30 nm ne semblait pas avoir de réalité *in vivo*, et que la chromatine aurait plutôt tendance à former une fibre de 5 à 24 nm de diamètre, ces variations de compaction lui permettant de s'adapter aux différents processus l'impliquant [Ou *et al.*, 2017 ; Misteli, 2020]. Les fibres de chromatines interagissent de plus entre elles, afin de former des boucles et des domaines topologiques qui structurent le génome à l'échelle du noyau [Misteli, 2020] (Figure 21), détaillés dans la prochaine section.

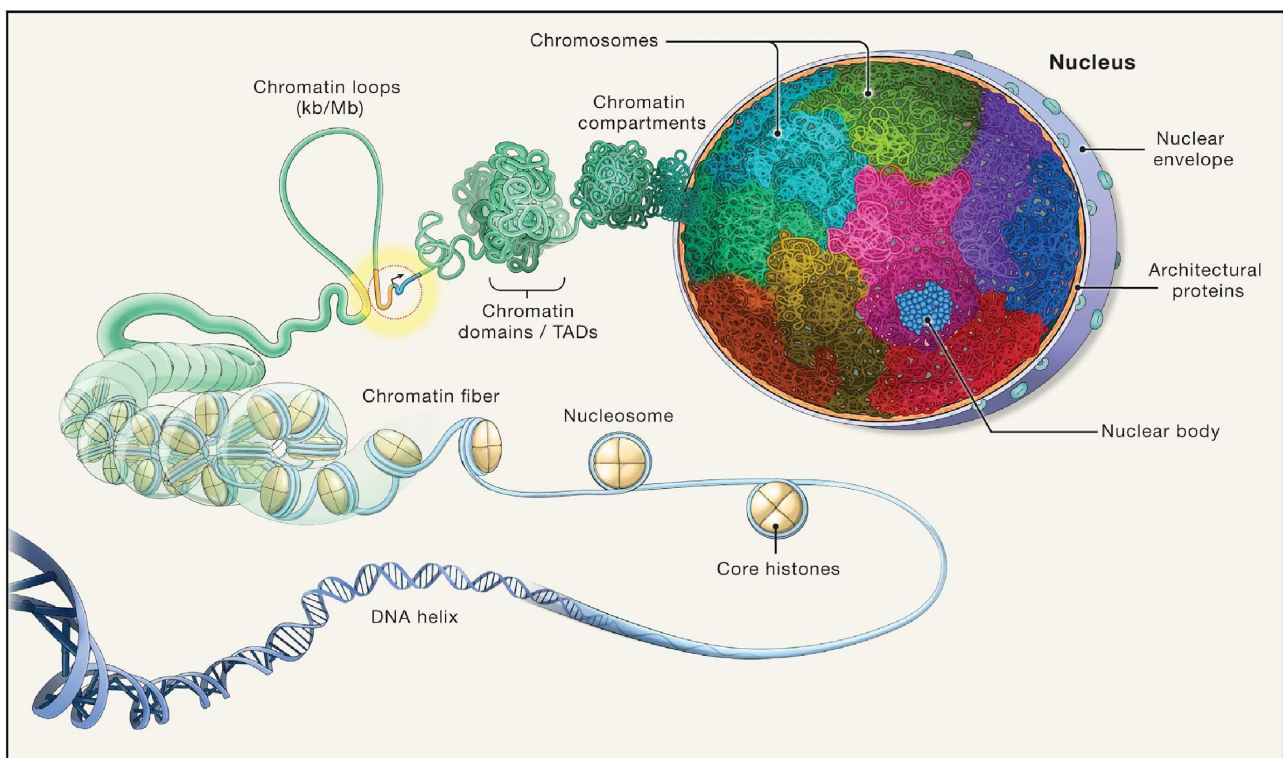


Figure 21: Les différents niveaux de compaction de la chromatine. Misteli, 2020.

Localement, la compaction de la chromatine est finement régulée en fonction des besoins cellulaires. Ainsi, les régions fortement transcrites sont associées à une chromatine assez peu compactée, l'euchromatine, alors que les régions peu actives telles que les télomères ou les centromères sont plus condensées, formant l'hétérochromatine [Fritz *et al.*, 2019]. Les histones de cœur peuvent être remplacés par des variants d'histones permettant de réguler le niveau de compaction local et les processus biologiques associés [Biterge & Schneider, 2014]. De plus, chaque type de région chromatinienne est associé à des marques épigénétiques spécifiques, majoritairement présentes sur les histones (à l'exception de la 5-mC et, éventuellement, de la 8-oxoG selon comment

on la considère), afin d'assurer une régulation plus fine de la compaction locale de la chromatine et des processus associés [Villaseñor & Baubec, 2021 ; Millán-Zambrano *et al.*, 2022]. Par exemple, les régions transcriptionnellement actives arborent une mono- ou triméthylation de la lysine 4 de H3 (H3K4me1 ou H3K4me3) et une acétylation de la lysine 27 de H3 (H3K27ac) (Figure 22) [Millán-Zambrano *et al.*, 2022] ; tandis que la répression de la transcription est plutôt associée à la triméthylation de cette même lysine (H3K27me3) (Figure 22) [Millán-Zambrano *et al.*, 2022]. Enfin, dans le cas particulier de la réparation qui, à l'inverse de la réplication ou de la transcription, n'est pas spécifiquement programmée et peut être nécessaire n'importe quand durant le cycle et n'importe où sur la chromatine, un remodelage local et spécifique peut être nécessaire [Lan *et al.*, 2014]. Comme évoqué précédemment, c'est majoritairement le rôle de PARP1, surtout dans le cas de la réparation des SSB. L'ajout de chaînes de PAR en grandes quantités au niveau des lésions va induire le recrutement de remodeleurs chromatiniens permettant la relaxation de la chromatine et l'accès aux facteurs de réparation [Gottschalk *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2017 ; Smith *et al.*, 2019]. D'autres facteurs peuvent cependant y participer, selon la voie de réparation mise en œuvre. C'est par exemple le cas de UV-DDB dans le cas du NER qui déstabilise les nucléosomes et permet de décondenser localement la chromatine [Beecher *et al.*, 2020].

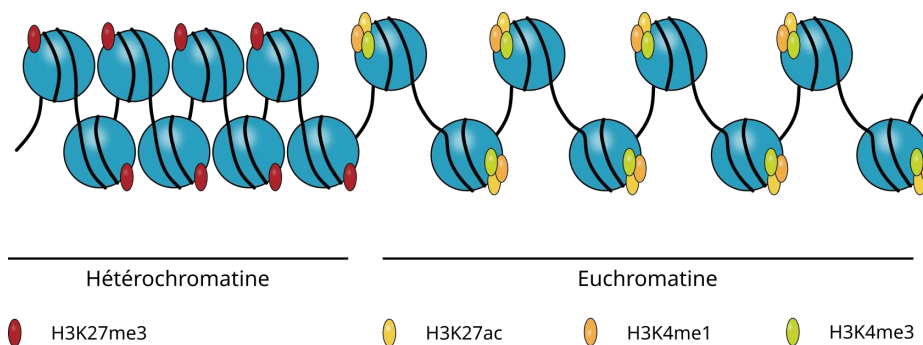


Figure 22: Régulation locale de la structure chromatinienne. Différences entre euchromatine et hétérochromatine : chacune arbore des marques épigénétiques spécifiques.

b. Boucles et domaines chromatiniens

Comme mentionné durant le paragraphe précédent, la chromatine est organisée sous forme de boucles et de domaines, pouvant aller de quelques dizaines de milliers de paires de bases pour les boucles, à plusieurs centaines pour les domaines [Misteli, 2020]. Ces régions sont structurées par les protéines de maintenance structurale des chromosomes (SMC – *Structure Maintenance of Chromosomes*), constitutives des complexes des cohésines (SMC1-SMC3) pour les plus connues, des

condensines (SMC2-SMC4) et du complexe SMC5-SMC6, moins étudié [Aragon *et al.*, 2013]. Tous sont impliqués dans la régulation de l'organisation chromatinienne, eux-mêmes étant régulés par une myriade d'autres protéines, dont la plus connue est CTCF [Jeppsson *et al.*, 2014 ; Uhlmann, 2016 ; Liu *et al.*, 2019], qui a également un rôle indépendant de barrière moléculaire prépondérant dans la régulation de la structure chromatinienne [Ren & Zhao, 2019]. Chacun de ces complexes forme une sorte d'anneau, constitué d'une charnière à la jonction des deux protéines SMC, et fermé par une kleisine, qui contacte chacune des SMC au niveau de leurs têtes, à l'opposé de la charnière (Figure 23). Différentes sous-unités se joignent à ces complexes de cœur afin de réguler leurs activités [Jeppsson *et al.*, 2014].

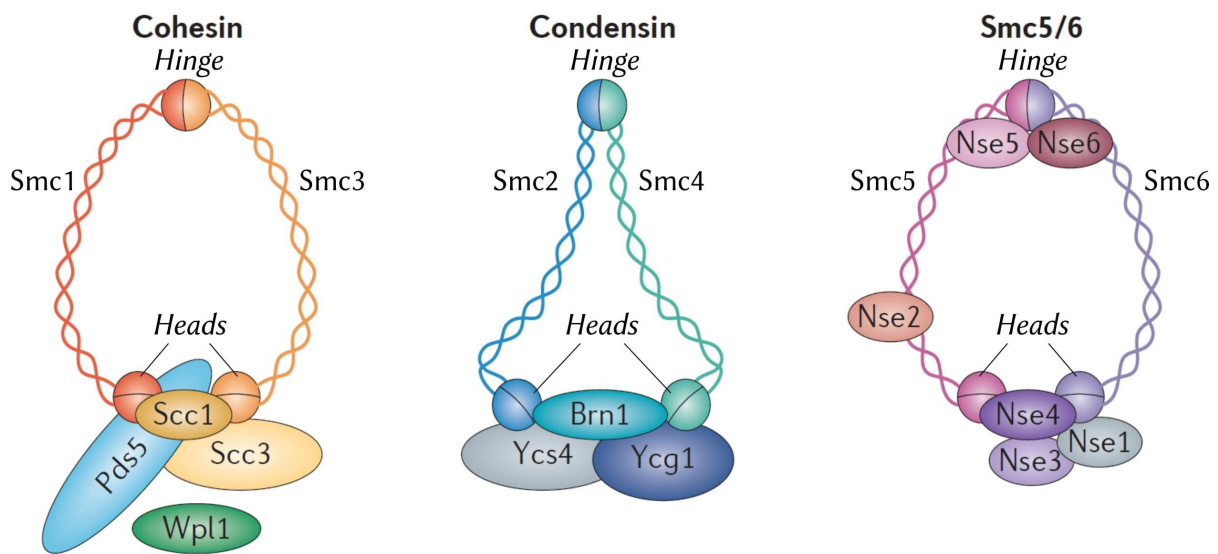


Figure 23: Structure des trois complexes SMC. Dans chaque cas, les trois sous-unités de cœur sont les deux protéines SMC, et la kleisine (SCC1, BRN1 et NSE14) faisant la jonction entre les protéines SMC. Les autres sous-unités permettent de réguler l'activité du complexe et ne sont pas détaillées ici. Adapté de Jeppsson *et al.*, 2014.

Les cohésines, majoritairement connues pour le maintien des chromatides sœurs durant la division cellulaire, jouent également un rôle prépondérant dans la topologie des chromosomes en interphase en créant des interactions longues distances, et en générant des boucles de chromatine et des domaines topologiquement associés (TAD – *Topologically Associated Domains*), les premières étant une sous-structure des seconds (Figure 21) [Misteli, 2020]. Par ce biais, les cohésines mettent en relation des éléments du génome initialement distants, comme les séquences régulatrices de gènes qui peuvent se trouver loin les unes des autres et/ou de la séquence codante du gène en question (Figure 24). A l'inverse, elles peuvent également séparer physiquement deux régions pourtant voisines, et les isoler l'une de l'autre (Figure 24) [Aragon *et al.*, 2013 ; Jeppsson *et al.*, 2014]. Ainsi, les

cohésines et la barrière moléculaire CTCF se trouvent enrichies au niveau des jonctions entre TAD [Fraser *et al.*, 2015 ; Ren & Zhao, 2019 ; Misteli, 2020]. Les TAD sont en grande majorité conservés d'un type cellulaire à l'autre, voire d'une espèce à l'autre ; mais les sous-domaines à l'intérieur des TAD varient de façon tissu-spécifique [Fraser *et al.*, 2015 ; Briand & Collas, 2020]. En effet, les gènes au sein d'un même TAD ont tendance à être co-exprimés, et, toujours au sein d'un même TAD, on note de nombreux contacts entre les boucles le constituant, alors qu'ils sont très peu nombreux entre régions de différents TAD [Fraser *et al.*, 2015 ; Briand & Collas, 2020]. Un type de domaine particulier sont les domaines associés à la lamina (LAD – *Lamina Associated Domains*). Ces domaines, comme leur nom l'indique, interagissent directement avec la lamina, et sont principalement situés en périphérie du noyau [van Steensel & Belmont, 2017]. Ils sont majoritairement constitués de régions pauvres en gènes et/ou inactives, autrement dit, d'hétérochromatine [van Steensel & Belmont, 2017].

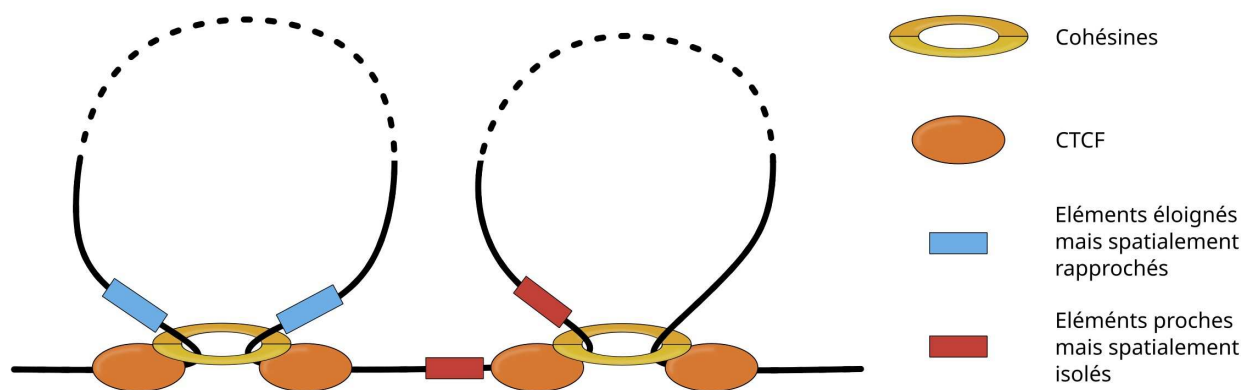


Figure 24: Isolement ou rapprochement d'éléments du génome par l'intermédiaire du complexe des cohésines et de CTCF.

Les condensines sont quant à elles impliquées dans la compaction des chromosomes, et en particulier dans la compaction du chromosome X durant son inactivation chez les individus XX. Deux complexes de condensines existent chez la majorité des eucaryotes, différenciés par des kleisines spécifiques [Jeppson *et al.*, 2014]. Les condensines ont également un rôle dans la régulation de la transcription en général et pas uniquement lors de l'inactivation du chromosome X, mais participent uniquement à l'inactivation de gènes [Kanno *et al.*, 2015]. Enfin, elles permettent de démêler les chromatides sœurs durant l'anaphase, en facilitant le recrutement et l'activation des topoisomérases de type II [Jeppson *et al.*, 2014]. Pour finir, le complexe SMC5/SMC6 est extrêmement mal connu. On sait qu'il a un rôle dans la recombinaison homologe en cas de DSB ou d'effondrement des fourches de réplication, et il semblerait qu'il permette la ségrégation correcte des

chromosomes lors de l'anaphase [Kanno *et al.*, 2015]. Il pourrait également avoir un rôle dans l'organisation de la structure chromatinienne [Jeppson *et al.*, 2014].

2. Impact de l'encombrement moléculaire sur la diffusion d'un traceur

Le noyau cellulaire est un environnement extrêmement encombré, et même si l'organisation spatiale du génome permet de regrouper certains éléments (comme c'est le cas des TAD par exemple), le volume que doit explorer une protéine pour trouver sa cible est énorme.

a. Découverte et formulation de la diffusion

Tous les processus biologiques (comme par exemple la recherche d'un dommage dans l'ADN par une protéine de réparation) nécessitent la rencontre de deux molécules ou davantage, qui elle-même repose sur la diffusion de ces molécules. Le phénomène de la diffusion a été observé dès le XIX^{ème} siècle, d'abord par le botaniste Robert Brown lors de l'étude au microscope de grains de pollen dans l'eau [Brown, 1828], puis par le physiologiste Adolf Fick observant la diffusion d'encre dans l'eau [Fick, 1855]. Ce dernier formalise mathématiquement ces observations en deux lois, appelées lois de Fick, fondatrices de l'étude des phénomènes de diffusion. La première loi décrit le flux d'un soluté suivant un gradient de concentration décroissant, la vitesse de ce flux étant proportionnelle à ce gradient [Weiss, 2014]. La seconde loi de Fick est une conséquence de la première, et prédit la variation de concentration en soluté du milieu du fait de sa diffusion [Weiss, 2014]. Ces équations prennent également en compte différents paramètres du milieu, tels que sa viscosité (plus le milieu est visqueux, plus la diffusion est ralentie), et sa température (plus elle haute, plus la diffusion est accélérée) [Weiss, 2014]. Un demi-siècle plus tard, le mouvement brownien a été modélisé par Einstein [Einstein, 1905], puis vérifié par Jean Perrin [Perrin, 1909], montrant ainsi que les particules de pollen ou d'encre étaient déplacées par les collisions avec des molécules d'eau.

Cependant, au sein des cellules, l'environnement dans lequel évoluent les molécules (protéines, lipides, petites molécules, etc.), est beaucoup plus dense et encombré que lors des expériences de Brown et Fick, ce qui a, de fait, un impact sur la diffusion.

b. Encombrement moléculaire et diffusion

5 % à 40 % du milieu intracellulaire est occupé par des macromolécules, laissant peu de place libre pour la diffusion d'autres molécules [Mourão *et al.*, 2014]. C'est en particulier le cas dans le noyau, où on considère en général que 30 % à 60 % de l'espace est occupé rien que par la chromatine [López-Velázquez *et al.*, 1996 ; Rouquette *et al.*, 2009]. Un tel encombrement produit trois effets principaux sur la diffusion : le premier est l'exclusion de volume, le deuxième est la gêne de la diffusion, et le troisième est le déplacement des équilibres entre deux réactifs de l'état dissocié vers l'état lié [Lebeaupin *et al.*, 2018]. L'exclusion de volume est le phénomène qui empêche la diffusion d'un traceur dans l'espace occupé par l'ensemble des macromolécules déjà présentes. Dans un milieu encombré, seule une fraction du volume est accessible au traceur. Par conséquent, certaines régions peuvent contenir moins de traceurs du fait d'un plus faible volume accessible dans ces zones. Ainsi,

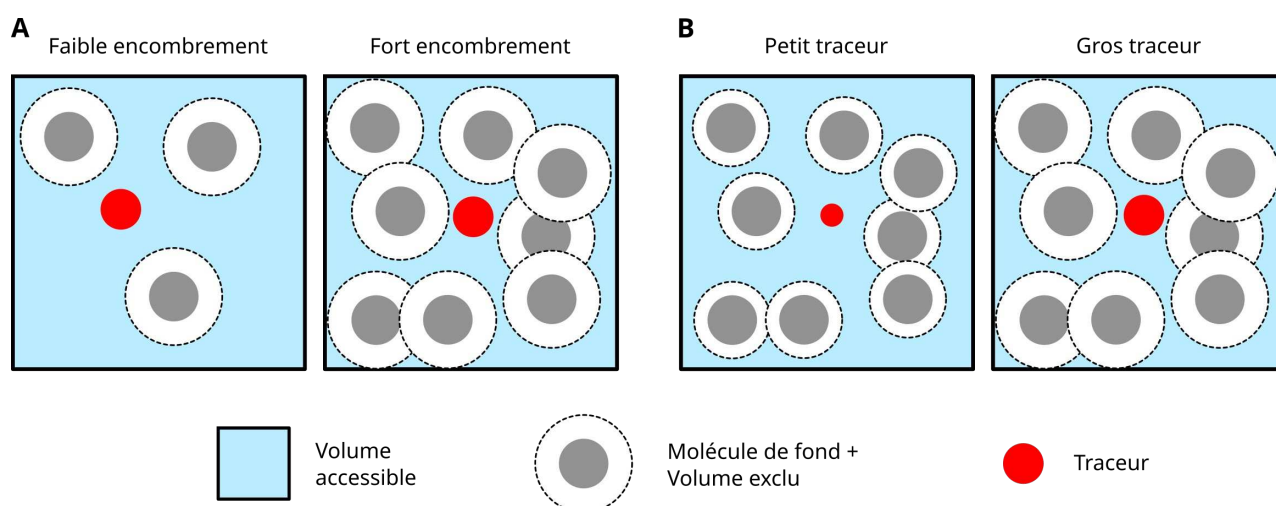


Figure 25: Représentation schématique de l'exclusion de volume. L'espace accessible au traceur (rouge) est représenté en bleu, tandis que celui dont il est exclu est représenté par un cercle en pointillé. **A.** Plus l'espace est encombré, moins le traceur a d'espace à sa disposition pour diffuser. **B.** Plus le traceur est gros, plus le volume dont il est exclu est gros. D'après Lebeaupin *et al.*, 2018.

si la concentration ramenée à l'espace accessible est constante car la diffusion lisse les gradients, des variations de concentration absolue des traceurs dans un milieu encombré hétérogène peuvent être constatées [Lebeaupin *et al.*, 2018]. De plus, le volume d'exclusion dépend également de la taille du traceur : plus il est gros, plus le volume dont il est exclu est gros (Figure 25) [Lebeaupin *et al.*, 2018]. Du fait de cette exclusion, le mouvement des protéines au sein de la cellule et du noyau peut être altéré et adopter des modes de diffusion non-browniens (détaillés dans le prochain paragraphe), les protéines rebondissant sur les éléments encombrants (par exemple la chromatine). Enfin, faire de la place pour laisser passer un traceur dans un environnement très encombré a un coût énergétique.

Une solution pour minimiser ce coût est de tendre vers les formes liées, favorisant ainsi les états multimériques des protéines, ou les liaisons ADN/protéines [Mourão *et al.*, 2014 ; Lebeaupin *et al.*, 2018]. En effet, la somme des volumes à trouver pour placer deux molécules séparées est généralement plus importante que le volume nécessaire au complexe de ces deux molécules, du fait du chevauchement des volumes exclus (Figure 26).

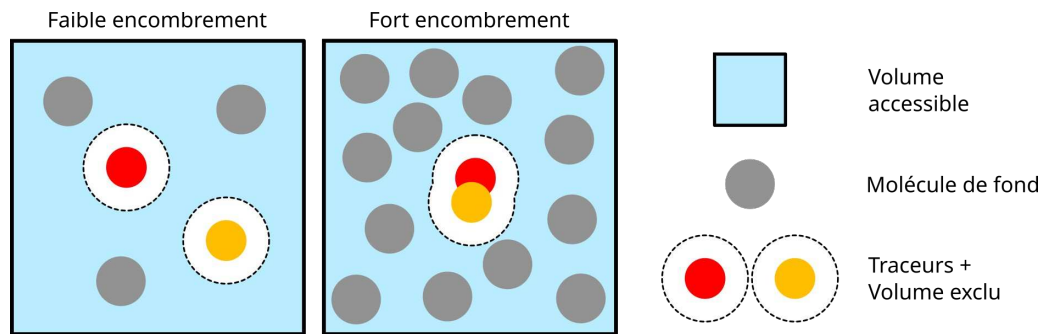


Figure 26: L'encombrement moléculaire tend à favoriser les formes liées des protéines.

Daprès Huet *et al.*, 2014 et Lebeaupin *et al.*, 2018.

Si l'impact de l'encombrement moléculaire semble à première vue plutôt défavorable aux processus cellulaires en restreignant la diffusion, de plus en plus d'études pointent vers un possible rôle de cet encombrement moléculaire sur la régulation de la physiologie cellulaire, ayant une potentielle implication dans des domaines aussi variés que la régulation du volume cellulaire, l'expression génique [Mourão *et al.*, 2014], l'architecture nucléaire [Lebeaupin *et al.*, 2018] ou la structure des membranes biologiques [Löwe *et al.*, 2020]. L'implication réelle de l'encombrement moléculaire sur les processus biologiques reste toutefois à déterminer.

c. Les différents modèles de diffusion observés en cellules

On trouve deux catégories de mouvements dans une cellule : les mouvements browniens ou qui en dérivent, et les mouvements dirigés. Ces derniers correspondent aux modes de transport actif le long des microtubules et de l'actine, et nécessitant une consommation d'énergie. Mes travaux de thèse portant sur la réparation de l'ADN nucléaire, et ce mode de transport ayant majoritairement lieu dans le cytoplasme, cette catégorie ne sera pas traitée ici.

i. La diffusion brownienne ou simple diffusion

Le mouvement brownien correspond donc au mouvement aléatoire d'une particule soumise aux collisions avec les molécules du solvant dans lequel elle se trouve. Il peut être décrit par son coefficient de diffusion D , qui s'exprime en $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Dans le cas de petites particules dont la taille est

inférieure au micromètre, l'équation de Stokes-Einstein (eq. 1) [Einstein, 1905 ; Sutherland, 1905] peut s'appliquer :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (1)$$

où T est la température, η est la viscosité du milieu, et R est le rayon de la particule. k est la constante de Boltzmann et est égale à $1.380649 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$. Ainsi, D augmente si la température augmente, et la viscosité ou le rayon de la particule diminue.

La mesure du coefficient de diffusion d'une particule est obtenue à partir de son déplacement quadratique moyen (MSD – *Mean Square Displacement*) qui correspond au carré de la distance moyenne parcourue durant un intervalle de temps δt (eq. 2) [Huet *et al.*, 2014]. Il s'exprime en μm^2 . Le tracé du MSD en fonction de δt permet d'obtenir une droite par régression linéaire. La pente de cette droite donne accès à D (eq. 3) :

$$MSD(\delta t) \propto \delta t \quad (2)$$

$$D = \frac{p}{2n} \quad (3)$$

où p est la pente de la droite, et n la dimension du mouvement considérée (1D, 2D ou 3D) [Weiss, 2008].

Le coefficient de diffusion peut également être obtenu par l'analyse de la dynamique de populations de molécules, telles que le retour de fluorescence après photoblanchiment ou la spectroscopie de corrélation de fluorescence. Ces deux techniques de microscopies seront détaillées ultérieurement.

ii. La diffusion anormale

Cependant, comme on a vu précédemment, en cellules la diffusion est souvent ralentie ou altérée du fait de l'encombrement moléculaire. Lorsqu'elle n'est que ralentie, généralement dans le cas où l'agent encombrant principal est relativement petit et mobile, D est plus petit, et la pente du MSD plus faible, mais on reste dans un cas de diffusion brownienne (Figure 27). Dans ce cas-ci, le milieu est considéré comme continu, et l'encombrement moléculaire impacte sa viscosité plutôt que le mode de diffusion des traceurs [Lebeau *et al.*, 2018]. Par contre, lorsque la molécule de fond est, en comparaison du traceur, grosse et statique, le mode de diffusion peut-être altéré ; on parle de diffusion anormale. C'est typiquement le cas des protéines, vis à vis desquelles les acides nucléiques et les autres protéines vont constituer des obstacles, alors que l'eau et les petits solutés font partie du

milieu continu. La représentation graphique du MSD est alors une courbe qui suit une loi de puissance et non une droite (Figure 27) [Lebeaupin *et al.*, 2018], et il ne dépend plus uniquement de δt , mais également d'un coefficient d'anomalie α (eq. 4). Lorsque l'on considère une diffusion brownienne, $\alpha = 1$; tandis que dans les cas de sous-diffusion anormale, α est inférieur à 1 [Huet *et al.*, 2014 ; Lebeaupin *et al.*, 2018].

$$MSD(\delta t) \propto \delta t^\alpha \quad (4)$$

Cette courbe traduit le fait qu'en cas de diffusion anormale, le traceur va avoir tendance à être confiné dans une sous-région de l'espace total, ce qui réduit ses chances de l'explorer en entier. Plus α est faible (donc plus l'espace est encombré), plus l'exploration d'un même volume est longue.

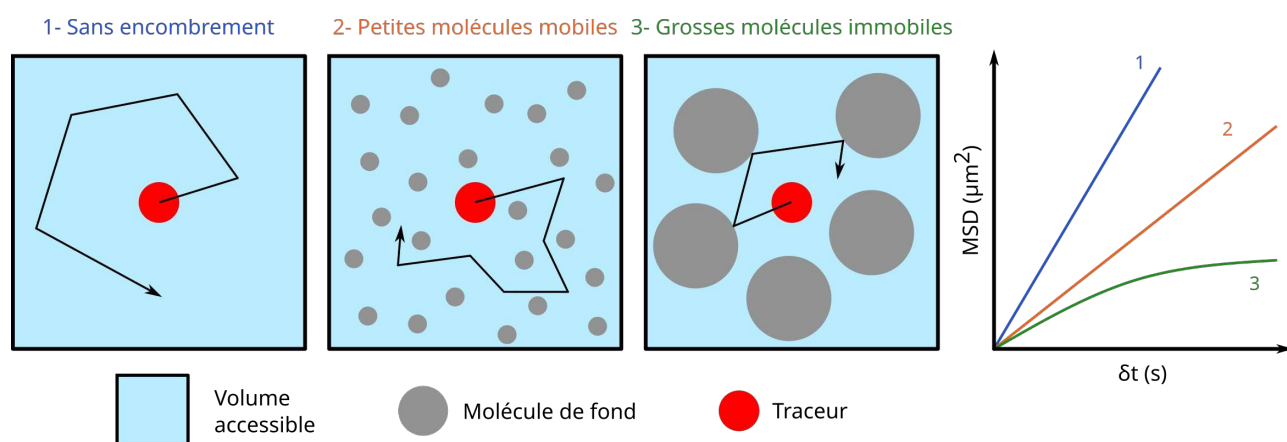


Figure 27: Impact de l'encombrement moléculaire sur la diffusion d'un traceur. La présence de petites molécules mobiles ne fait que ralentir la diffusion (2), alors que celle de grosses molécules statiques la rend anormale (3), ce qui est illustrée par la courbe du MSD correspondant. D'après Lebeaupin *et al.*, 2018.

II. Trouver sa cible au sein de l'environnement complexe du noyau

Les protéines interagissant avec l'ADN doivent donc naviguer dans cet environnement dense et encombré, et trouver leur cible malgré la présence d'autres protéines sur l'ADN, à commencer par les protéines de structure (histones, SMC, CTCF, etc.), mais également toutes celles impliquées dans des processus impliquant une liaison à l'ADN (réplication, transcription, réparation). La tâche n'est donc pas simple, on s'approche fortement de la recherche d'une aiguille dans une botte de foin.

1. Le modèle des facteurs de transcription

a. Impact de la structure chromatinienne sur la capacité d'une protéine à trouver sa cible

Ainsi, les moyens de recherche d'une cible à la disposition d'une protéine de liaison à l'ADN (DBP – *DNA Binding Protein*) reposent sur la diffusion. Deux paramètres principaux caractérisent l'efficacité de cette recherche : le temps moyen de premier passage (MFPT – *Mean First Passage Time*), et le temps de couverture. Le MFPT permet d'estimer la durée nécessaire à la rencontre entre le traceur et sa cible, tandis que le temps de couverture caractérise le temps nécessaire à l'exploration exhaustive d'une zone donnée [D'Augustin *et al.*, 2020]. De façon assez intuitive, plus le volume à explorer est petit, plus le MFPT et le temps de couverture vont être réduits, et inversement. Cependant, un autre facteur qui va avoir une forte influence sur ces paramètres est l'organisation

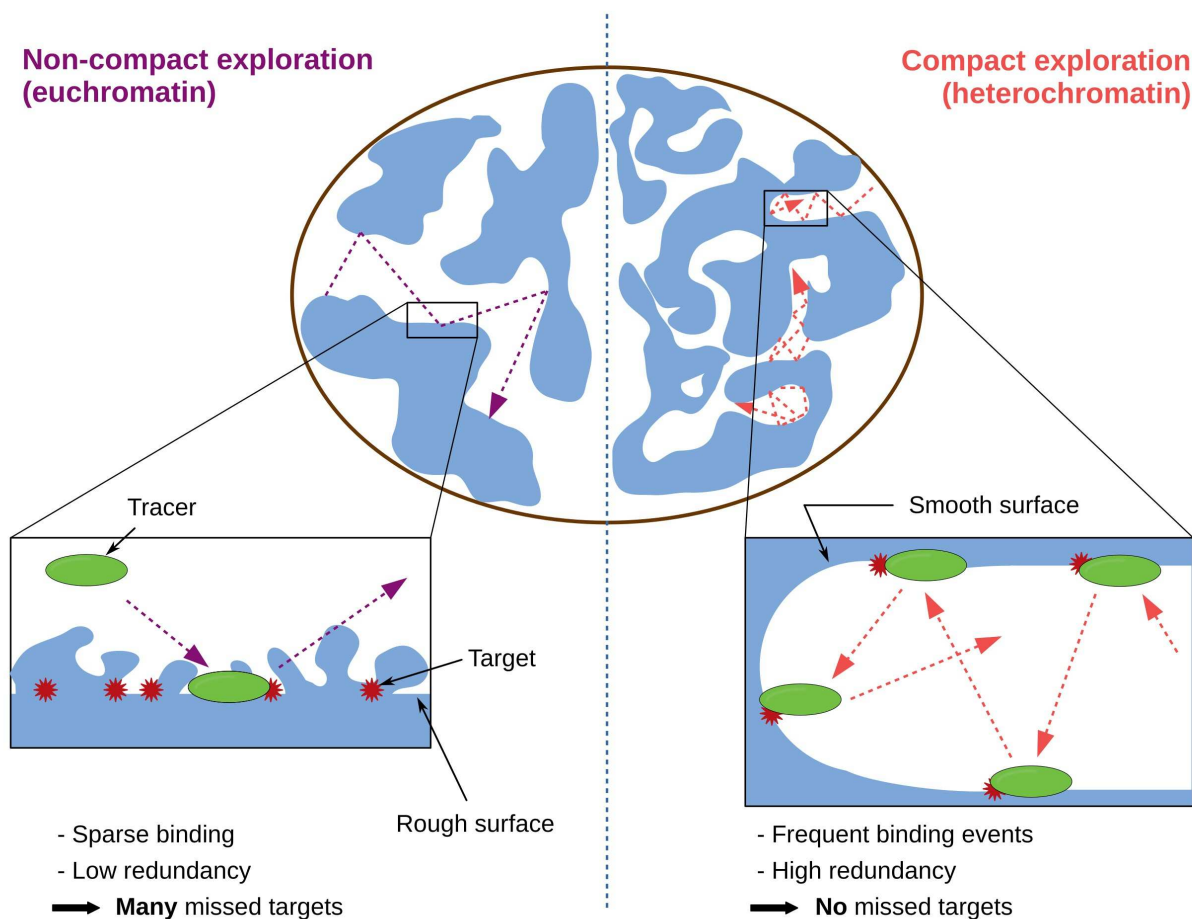


Figure 28: Exploration compacte (à droite) et non-compacte (à gauche). L'exploration non compacte a tendance à manquer beaucoup de cibles, alors qu'à l'inverse, l'exploration compacte sur-échantillonne la région où se trouve le traceur. Adapté de D'Augustin *et al.*, 2020.

spatiale de la chromatine, et surtout la rugosité de l'interface entre le nucléoplasme et la chromatine [Bancaud *et al.*, 2009 ; Huet *et al.*, 2014 ; D'Augustin *et al.*, 2020]. En effet, une surface lisse, telle qu'on en retrouve majoritairement en hétérochromatine va favoriser une exploration dite compacte, durant laquelle la DBP va avoir tendance à se lier de nombreuses fois dans la même région, lui permettant donc une recherche localement exhaustive de sa cible (Figure 28). A l'inverse, une surface rugueuse comme on en observe en euchromatine, favorisera une exploration dite non-compacte, où la DBP va réaliser une recherche plus éparse en se liant à des régions génomiques plus distantes les unes des autres (Figure 28) [Bancaud *et al.*, 2009 ; Huet *et al.*, 2014 ; D'Augustin *et al.*, 2020]. Ainsi, la structure va avoir un effet ambivalent sur le MFPT, qui dépend de la distance d entre le point de départ du traceur et sa cible. Lorsque l'exploration est compacte, le MFPT augmentera proportionnellement à d (Figure 29A) ; tandis que dans le cas d'une exploration non-compacte, le MFPT dépend peu de d (Figure 29B) [Lebeaupin *et al.*, 2018].

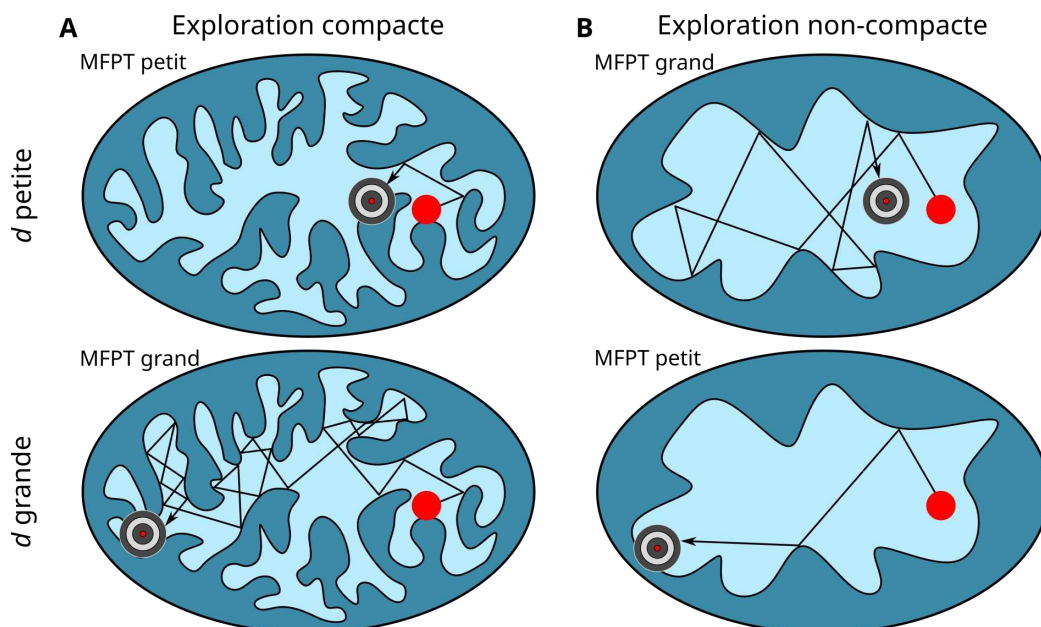


Figure 29: Impact de la distance d entre le point de départ du traceur et sa cible, en exploration A. compacte et B. non-compacte.

b. Mise en évidence de la diffusion facilitée

Les protéines à la recherche d'une région cible dans l'ADN font face à un défi à la fois cinétique et thermodynamique, généralement appelé le paradoxe vitesse/spécificité [Leven & Levy, 2019]. En effet, elles doivent se lier à des sites de quelques paires de bases à la fois spécifiquement et suffisamment rapidement pour ne pas compromettre la régulation du processus dans lequel elles sont impliquées, au milieu de milliers d'autres paires de bases, et cela dans l'environnement dense et

encombré qu'est le nucléoplasme. Originellement, la question de savoir comment une protéine de liaison à l'ADN (DBP – *DNA Binding Protein*) trouve sa cible a principalement été étudiée grâce aux protéines reconnaissant des séquences spécifiques telles que les TF, LacI [Riggs *et al.*, 1970 ; Berg *et al.*, 1981 ; Winter *et al.*, 1981] ou TetR [Normanno *et al.*, 2015]. Dès les premières études *in vitro* sur LacI [Riggs *et al.*, 1970], les auteurs avaient pu constater que la constante d'association de LacI avec l'opérateur était « plus rapide que la limite de diffusion » prédite par Smoluchowski [Smoluchowski 1918 ; Alberty & Hammes, 1958]. Dès lors, les auteurs avaient envisagé le fait que LacI puisse glisser le long de l'ADN, ce qui accélérerait la reconnaissance de l'opérateur. Ils avaient toutefois rejeté cette hypothèse, du fait de la faible affinité de LacI pour l'ADN (hors séquence consensus), et car ils supposaient que LacI était attiré par l'ADN par l'intermédiaire de forces électrostatiques à relativement longue distance. Cette première intuition de glissement le long de l'ADN a pourtant été validée par la suite par de nombreuses études pour un grand nombre de protéines interagissant avec l'ADN, d'abord *in vitro* sur de l'ADN nu [Belintsev *et al.*, 1980 ; Park *et al.*, 1982 ; Terry *et al.*, 1985 ; Bonnet *et al.*, 2008], puis sur de la chromatine reconstituée [Hannon *et al.*, 1986], et enfin en cellules vivantes [Elf *et al.*, 2007 ; Stracy *et al.*, 2021]. Du fait de l'évolution constante des techniques, en particulier en microscopie optique et en simulations informatiques, c'est un champ de recherche encore très actif à l'heure actuelle [Normanno *et al.*, 2015 ; Shin & Kolomeisky, 2019 ; Kamagata *et al.*, 2020 ; Stracy *et al.*, 2021].

Ce type de diffusion particulier, appelé diffusion facilitée, a été formellement décrit dès 1981 [Berg *et al.*, 1981]. Il est aujourd'hui admis que c'est le mode de recherche d'une cible dans l'ADN

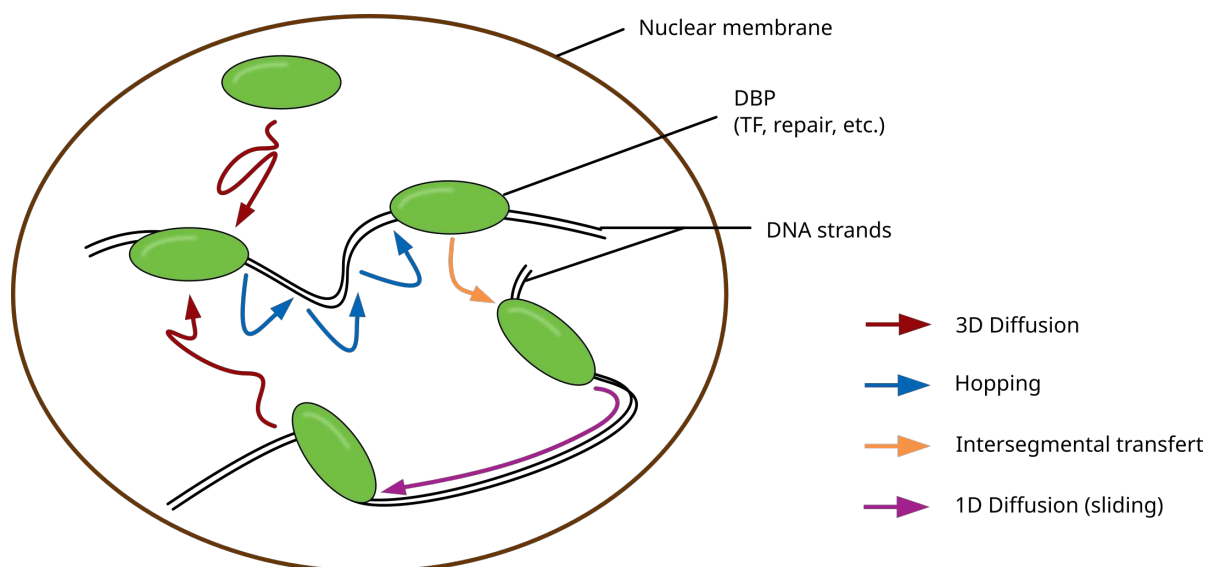


Figure 30: Représentation schématique de la diffusion facilitée et des différents modes de diffusion impliqués. Adapté de D'Augustin *et al.*, 2020.

prédominant chez les DBP. On appelle communément diffusion facilitée un phénomène diffusif incluant des phases de diffusion 3D dans le nucléoplasme, entrecoupées de phases de glissement 1D non-spécifiques le long de la chromatine (Figure 30) [Kampmann, 2005 ; Normanno *et al.*, 2012, 2015]. Ces phases de glissement le long de l'ADN sont encore mal comprises, mais il semblerait que les DBP ne restent pas constamment liées à l'ADN. Elles pourraient se décrocher transitoirement, lorsque le passage est bloqué par d'autres protéines, tout en restant dans la zone d'emprise électrostatique de la chromatine [Cravens, *et al.*, 2014 ; Normanno *et al.*, 2015], soit environ 1 à 1.5 nm, correspondant à la couche du nuage d'ions entourant l'ADN [Hamilton *et al.*, 2022]. Ce phénomène est dénommé *hopping* en anglais. Durant ces brefs détachements de la chromatine, au lieu de se relier au même endroit ou dans les environs très proches, les protéines peuvent passer sur un brin voisin, sans pour autant quitter la zone d'emprise électrostatique de l'ADN (Figure 30) [Tafvizi *et al.*, 2011 ; Normanno *et al.*, 2015 ; D'Augustin *et al.*, 2020]. On suppose que ce mode de diffusion pourrait fortement contribuer aux mécanismes de recherche de cible au sein du noyau.

c. Modèles sous-tendant la dynamique des protéines de liaison à l'ADN

Du fait que la diffusion facilitée implique une liaison à l'ADN, même non-spécifique, trois types de régimes peuvent régir la dynamique des DBP [Michelman-Ribeiro *et al.*, 2009], définis par le processus limitant. Le premier régime, dit diffusion-limité, suppose que la dynamique de la DBP d'intérêt répond principalement aux lois de la diffusion, qui est par conséquent le processus limitant. On considère alors que le temps passé lié à l'ADN est négligeable en comparaison de celui passé en diffusion 3D [Michelman-Ribeiro *et al.*, 2009]. A l'inverse, dans le cas du second régime, dit réaction-limité, c'est le temps de liaison à l'ADN qui est limitant ; et considéré comme infiniment long en comparaison des épisodes de diffusion 3D, alors supposés négligeables [Beaudouin *et al.*, 2006 ; Michelman-Ribeiro *et al.*, 2009]. L'ADN étant considéré comme immobile aux temps d'observation, les DBP sont également considérées comme transitoirement immobiles durant leurs phases d'interaction avec l'ADN [Houtsmuller, 2005]. Enfin, le dernier régime, dit régime mixte, est, comme son nom l'indique, un intermédiaire entre les régimes diffusion limité et réaction limité. Les temps caractéristiques de chacun des deux états sont alors similaires, et aucun des deux n'est négligeable en comparaison de l'autre [Michelman-Ribeiro *et al.*, 2009]. Les méthodes permettant de déterminer lequel de ces régimes suit une protéine d'intérêt seront détaillées au prochain chapitre. De plus, il est à noter que les temps caractéristiques de chacun des états (lié/diffusif) dépend de plusieurs

paramètres (affinité de la DBP pour l'ADN, taille, charge, etc.). Chaque protéine va par conséquent présenter des temps caractéristiques qui lui sont propres.

2. Le cas des protéines de réparation

a. Détecter une lésion

Les protéines de réparation font face à un défi du même type que les TF, mais à différents degrés. Il est généralement admis que, similairement aux TF, les facteurs de réparation font appel à la diffusion facilitée pour surveiller le génome [Esadze & Stivers, 2018 ; Howard & Wilson, 2018]. Toutefois, d'autres stratégies complémentaires peuvent être utilisées par la cellule pour accélérer le processus. Comme expliqué dans le chapitre consacré aux types de dommages de l'ADN, tous n'ont pas les mêmes conséquences sur la structure de la double hélice et certains sont donc plus faciles à détecter que d'autres. Ainsi, les SSB et DSB, ou les dimères de pyrimidine qui induisent de grosses déformations locales de l'ADN sont relativement facilement repérés par les mécanismes de surveillance du génome. Les déformations conformationnelles de la double-hélice induites par ces types de dommages vont également être plus facilement détectées lors de la transcription [Lans *et al.*, 2019] ou la réplication [Cortez, 2019], lorsque les polymérases buttent et restent bloquées dessus, signalant ainsi la présence du dommage.

Une autre façon de faciliter la détection de lésions pour les protéines impliquées dans les étapes plus en aval de la réparation est de regrouper les dommages dans des endroits restreints et définis du noyau. Ainsi, l'induction de DSB a été corrélée avec la formation de foci contenant les protéines nécessaires à leur réparation [Rothkamm *et al.*, 2015 ; Schrank & Gautier, 2019]. Ces foci se comportent comme des gouttelettes de séparation de phase liquide-liquide, permettant ainsi de les isoler du reste du noyau [Schrank & Gautier, 2019]. Le rôle exact de ces foci n'est pas encore bien défini, et un grand nombre d'hypothèses susceptibles de l'expliquer cohabitent [Bekker-Jensen & Mailand, 2010 ; Fijen & Rothenberg, 2021]. L'une d'elles suggère que regrouper au même endroit les cassures et les protéines de réparation permettrait de faciliter le processus de réparation en concentrant les protéines impliquées dans ce processus et ainsi en accélérant les réactions biochimiques nécessaires à la restauration de l'intégrité génomique [Lisby & Rothstein, 2009 ; Bekker-Jensen & Mailand, 2010]. Ce genre de relocalisation a pu être reporté très ponctuellement pour d'autres voies de réparation comme le TC-NER [Scalera *et al.*, 2021] ou le BER [Campalans *et al.*, 2007], mais absolument pas dans les mêmes proportions que pour les DSB. C'est par contre un phénomène couramment observé lors de la transcription, formant ainsi des « usines de

transcription » [Kimura & Sato, 2022], ce qui pourrait suggérer un phénomène assez répandu même si encore assez peu étudié dans le cas de la réparation en dehors des DSB.

Dans la même logique, il a récemment été montré que les régions génomiques les plus riches en contacts intra-chromosomiques, et donc où les conséquences de dommages (en particulier de DSB) pouvaient être particulièrement délétères, étaient enrichies en facteurs de réparations, et ce même en l'absence de dommages induits [Sobhy *et al.*, 2019]. Les auteurs supposent que cet enrichissement en facteurs de réparations à ces points stratégiques du génome permet d'augmenter la rapidité de détection d'éventuels dommages, limitant ainsi leurs conséquences.

b. Le cas complexe de la 8-oxoG

Malgré les stratégies mises en place par la cellule pour maximiser les chances de détecter rapidement les lésions, la détection de petites modifications de bases comme la 8-oxoG est beaucoup plus complexe. En effet, la cellule ne peut pas compter sur le blocage des polymérases, puisqu'elles incorporent efficacement (à défaut de correctement) une adénine ou une cytosine face à la 8-oxoG [Kouchakdjian *et al.*, 1991 ; Shibutani *et al.*, 1991 ; Kitsera *et al.*, 2011], et cette dernière n'induit pas non plus de déformations conformationnelles de la double-hélice [Lipscomb *et al.*, 1995]. De plus, OGG1, ni aucune des autres ADN-glycosylases, ne fait partie des facteurs de réparation trouvés enrichis dans les régions formant de nombreux contacts intra-chromosomiques [Sobhy *et al.*, 2019]. OGG1, ainsi que la majorité des autres ADN-glycosylases, doit donc soigneusement examiner chaque paire de base pour s'assurer qu'aucune n'est altérée. Pour cela, elle ne fait pas exception et plusieurs études *in vitro* montrent qu'OGG1 semble suivre un modèle de diffusion facilitée [Blainey *et al.*, 2006, 2009 ; Rowland *et al.*, 2014 ; Vestergaard *et al.*, 2018]. Ces études, en plus de vérifier la diffusion facilitée d'OGG1, ont permis de mettre en évidence que les phases de diffusion 1D non-spécifique le long de l'ADN étaient en réalité composées d'un glissement rotationnel durant lequel OGG1 présentait toujours la même face à l'ADN [Blainey *et al.*, 2009]. Ce résultat est cohérent avec le fait qu'OGG1 est supposée insérer un acide aminé, Y203, au sein de la double hélice durant ses phases de glissement aspécifiques afin de sonder la présence des lésions [Banerjee *et al.*, 2005, 2006 ; Dunn *et al.*, 2011], ce qui ne serait pas possible en cas de glissement rectiligne.

Ces données, pour informatives qu'elles soient, ont toutefois été réalisées sur de l'ADN nu, un contexte donc bien différent de la réalité cellulaire. Ainsi, des études, toujours *in vitro* mais avec de la chromatine reconstituée, montrent que la présence de nucléosomes bloque l'excision de la 8-oxoG par OGG1 [Menoni *et al.*, 2007, 2012], suggérant que les nucléosomes pourraient entraver le

processus de recherche de la 8-oxoG. L'ajout de remodeleurs chromatiniens tels que SWI/SNF est alors nécessaire au bon fonctionnement de l'ADN-glycosylase [Menoni *et al.*, 2007, 2012]. Plus récemment, il a également été montré, *in vitro* encore, que dans un environnement simulant l'encombrement moléculaire du noyau, l'ajout d'agents encombrants inertes améliorerait l'efficacité de glissement le long de l'ADN d'OGG1 [Cravens & Stivers, 2016]. Les auteurs expliquent ce résultat par le fait que le volume d'exclusion ainsi généré autour des brins d'ADN laisse le champ libre aux ADN-glycosylases pour diffuser le long de la double hélice. Il est toutefois à noter que cette étude utilisait de l'ADN nu dans un tampon aqueux, et non pas de la chromatine reconstituée avec histones et remodeleurs chromatiniens. En cellules, lors d'un stress oxydant, il a été montré qu'OGG1 est retenu à la fraction chromatinienne après extraction de la fraction soluble et fixation [Amouroux *et al.*, 2010] ; et que sa dynamique est fortement ralentie en cellules vivantes [Lebraud *et al.*, 2020]. De plus, l'induction locale de 8-oxoG par micro-irradiation laser en cellules vivantes induit un recrutement rapide d'OGG1 à la zone de dommages [Campalans *et al.*, 2013]. Par ailleurs, un nombre croissant d'études suggère l'implication de cofacteurs (en particulier des protéines impliquées dans le NER, telles que UV-DDB ou XPC) dans le recrutement d'OGG1, facilitant ainsi la localisation de la lésion [Parlanti *et al.*, 2012 ; Jang *et al.*, 2019 ; Kumar *et al.*, 2020a, 2020b, 2022].

III. Conclusion du chapitre

Ce chapitre nous a permis de voir que l'environnement cellulaire, et en particulier le noyau, était un environnement très encombré, impactant de fait le mode de déplacement des protéines. Ainsi, les DBP à la recherche d'une cible spécifique au sein de l'ADN ont tendance à adopter un mode de diffusion dit facilité, alternant des phases de glissements aspécifiques le long de l'ADN, potentiellement entrecoupées de petits sauts (*hopping*) et des phases de diffusion 3D au sein du nucléoplasme. Toutefois, ces mécanismes ont en immense majorité été étudiés *in vitro*, et les études en cellules manquent encore, particulièrement concernant OGG1.

L'un des objectifs de ma thèse était donc d'étudier la dynamique d'OGG1 en cellules vivantes, afin de mieux comprendre son mode de recherche de la 8-oxoG, et quels modèles biophysiques sous-tendent sa dynamique. Une technique d'étude particulièrement adaptée est la microscopie de fluorescence, développée au prochain chapitre.

Chapitre IV. Dynamique des protéines et microscopie confocale

I. Introduction à la microscopie confocale

1. Brève histoire de la microscopie

Si l'usage de sphères de verre grossissantes est attesté dès l'antiquité grecque et romaine [Bardell, 2004], les premières mentions de microscopes composés (comprenant au minimum un objectif et un oculaire) remontent à la fin du XVI^{ème} siècle aux Pays-Bas. Cependant, les premières grandes améliorations attestées du microscope reviennent à Robert Hooke et Antoni van Leeuwenhoek, scientifiques anglais et néerlandais du XVII^{ème} siècle. Le microscope de Hooke grossissait jusqu'à 50X, lui permettant de réaliser les premières descriptions de cellules ou petits animaux (poux, puces, etc.) publiés dans un livre intitulé *Micrographia* [Hooke, 1665]. van Leeuwenhoek, quant à lui, a réussi à obtenir des grossissements allant jusqu'à près de 300X, grâce auxquels il a pu décrire de nombreuses structures biologiques telles que les plumes, poils, capillaires sanguins, et bien d'autres ; mais surtout de découvrir l'existence d'*animacula*, les micro-organismes. Il est ainsi le premier à décrire des protozoaires et des bactéries [Corliss, 1975]. Il publie ses découvertes biologiques dans des lettres envoyées à la Royal Society de Londres, mais garde pour lui ses secrets de fabrication optique. Des décennies de plus seront nécessaires pour obtenir des performances optiques similaires.

Ce chapitre sera consacré aux principes de fonctionnement de la microscopie optique.

2. Lumière et Microscopie

a. Nature de la lumière

La lumière est à la fois une onde électromagnétique et une particule élémentaire dépourvue de masse, le photon. De fait, elle peut être étudiée sous l'angle de l'électromagnétisme et de l'optique physique quand on s'intéresse à elle comme à une onde ; mais également sous l'aspect de l'optique quantique lorsque l'on considère sa nature de particule. Ce deuxième aspect ne sera pas considéré ici. Les ondes électromagnétiques vont des rayons γ aux ondes radios longues (Figure 31) [Anatomy of an Electromagnetic Wave | Science Mission Directorate – Nasa]. Communément, on admet que la

lumière comprend la partie visible de ce spectre, parfois additionnée des longueurs d'ondes bordantes, les UV et les infra-rouges (IR). Une onde électromagnétique est définie par sa longueur d'onde λ , son intensité, sa polarisation et sa direction de propagation. Lorsque l'on s'intéresse à la lumière visible, la longueur d'onde définit la couleur de la lumière. Plus la longueur d'onde augmente (donc plus la fréquence diminue), moins l'onde est porteuse d'énergie. Ces deux paramètres sont reliés par la relation suivante [Cassidy *et al.*, 2002] :

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (5)$$

où c est la vitesse de la lumière dans le vide ($299\,792\,458 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) et f est la fréquence (en Hertz). Ainsi, les lumières bleues sont beaucoup plus énergétiques que les lumières rouges.

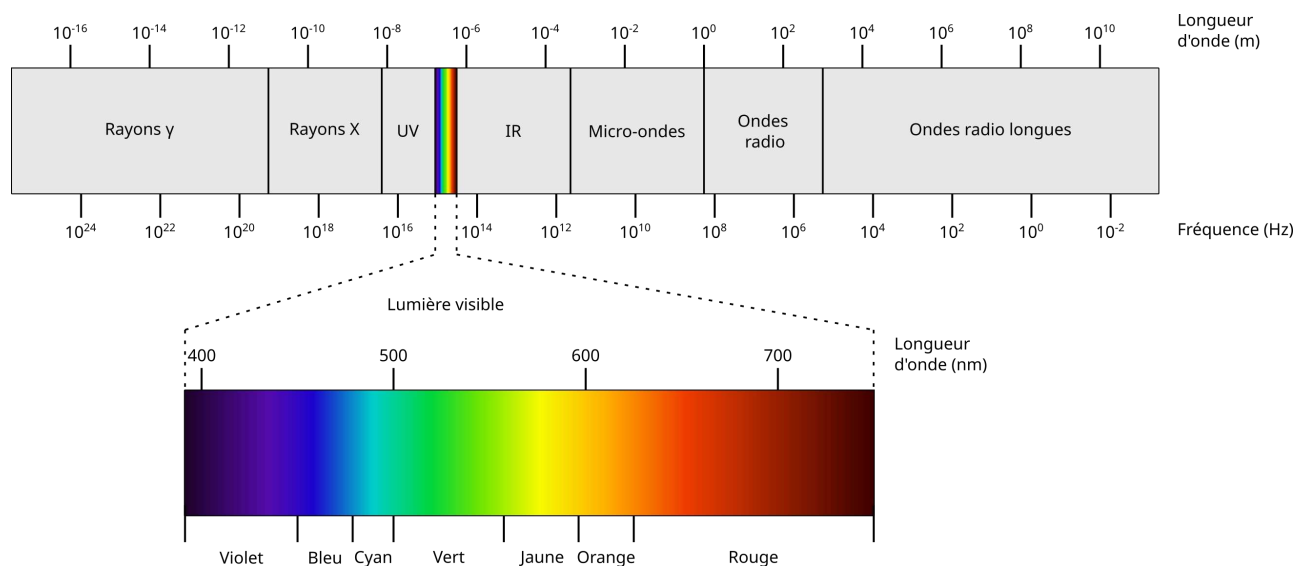


Figure 31 : Spectre des ondes électromagnétiques.

La lumière peut être mono- ou polychromatique. Une lumière monochromatique ne contient qu'une seule longueur d'onde (et n'a par conséquent qu'une seule couleur). C'est par exemple le cas des lasers, conçus dans ce but. A l'inverse, une lumière polychromatique contient plusieurs longueurs d'onde. La majorité des sources lumineuses produit des lumières polychromatiques. Une lumière contenant toutes les longueurs d'onde du spectre du visible (comme c'est le cas de la lumière émise par le Soleil) est appelée lumière blanche.

Lorsqu'une lumière est émise, elle se propage dans toutes les directions, formant une sphère dont le centre est la source lumineuse. Cependant, en s'éloignant de la source, le front d'onde s'aplatit de plus en plus. Sur de très grandes distances (ex : la lumière en provenance du Soleil), on considère que les rayons lumineux sont parallèles et que le front d'onde est plan (Figure 32A). Les

ondes se propagent selon un champ électrique et un champ magnétique, perpendiculaires entre eux, et tout deux perpendiculaires au front d'onde (Figure 32B).

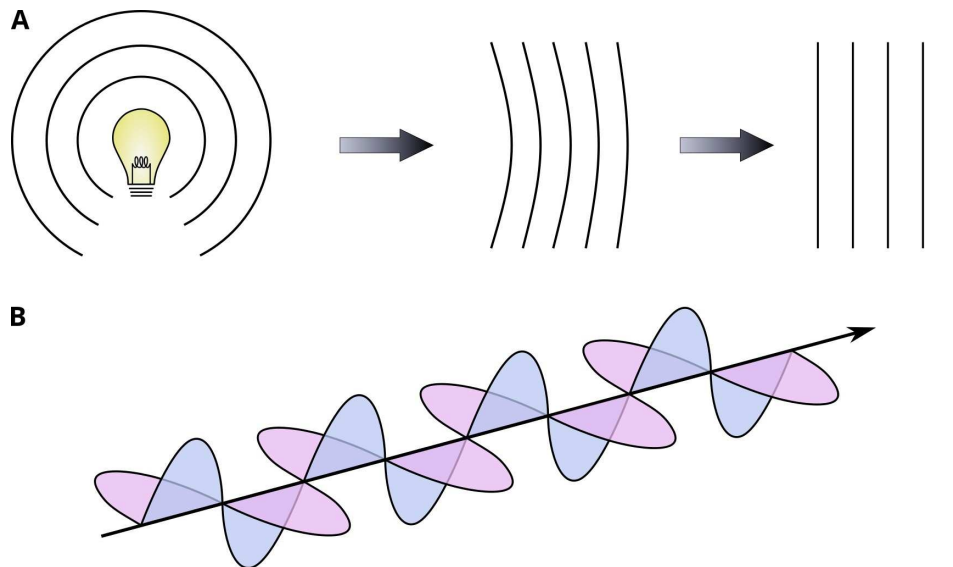


Figure 32: Propagation d'une onde électromagnétique. A. Le front d'onde est sphérique proche de la source lumineuse, et s'aplanit avec la distance. **B.** Une onde électromagnétique est composée d'un champ électrique (bleu) et d'un champ magnétique (violet) orthogonaux l'un à l'autre, et à la direction de propagation de l'onde (flèche noire).

La polarisation de la lumière fait référence au plan d'oscillation du champ électrique. La majorité des sources lumineuses produit des ondes dont le plan de polarisation varie de manière aléatoire. Cette lumière est dite non-polarisée [[Introduction to Polarized Light – Nikon Microscopy](#)]. La polarisation peut être sélectionnée en faisant passer la lumière dans un polarisateur, un élément optique bloquant toutes les ondes dont la polarisation n'est pas orientée dans le sens voulu, générant ainsi une polarisation linéaire (Figure 33). Le plan d'oscillation peut également tourner sur lui-même, menant alors à une polarisation circulaire.

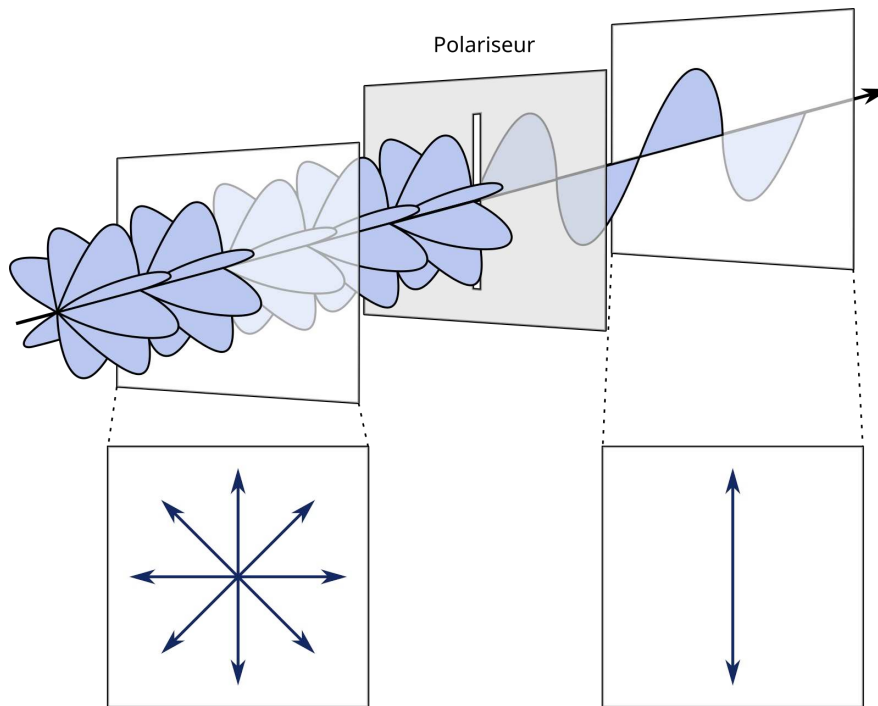


Figure 33: Polarisation linéaire de la lumière. Seuls les champs électriques sont représentés. Avant le passage dans le polariseur, la lumière oscille dans toutes les directions. Après le passage dans le polariseur, seule la lumière oscillant dans la direction voulue est encore présente.

b. Réfraction, réflexion et lois de Snell-Descartes

Lorsque la lumière change de milieu, sa trajectoire est déviée en fonction de son angle d'incidence et des indices de réfraction de chacun des milieux. L'indice de réfraction n est défini comme la capacité d'un milieu à ralentir la lumière par rapport au vide, et est donné par la formule (eq. 6) :

$$n = \frac{c}{v} \quad (6)$$

où c est la célérité, et v est la vitesse de la lumière dans le milieu considéré. La relation entre l'angle d'incidence et l'indice de réfraction a été découverte indépendamment par deux physiciens néerlandais et français du XVII^{ème} siècle, Willebrord Snell et René Descartes (eq. 7) :

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (7)$$

où n_1 et n_2 sont les indices de réfractations des milieux, et θ_1 et θ_2 sont les angles incident et réfracté, respectivement (Figure 34).

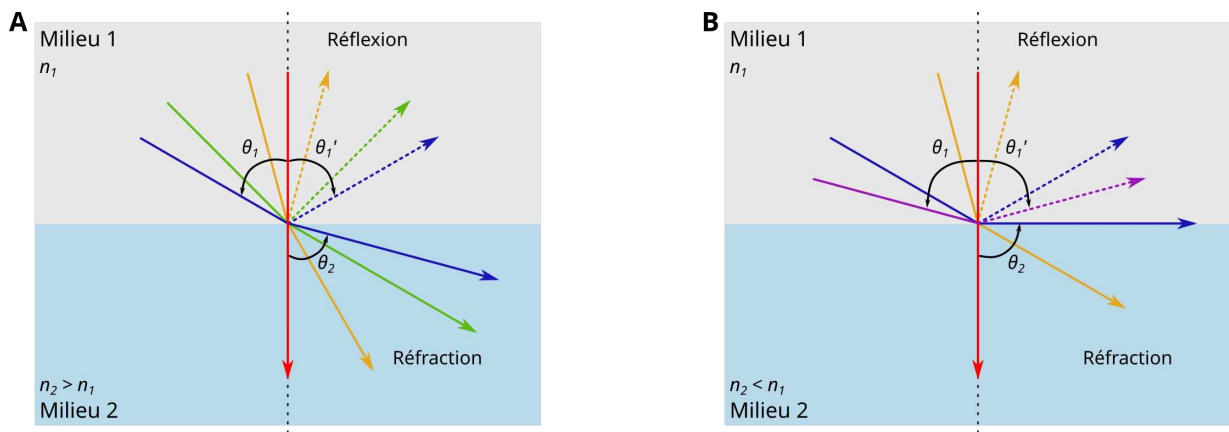


Figure 34: Réfraction et Réflexion. n_1 et n_2 sont les indices de réfraction des milieux 1 et 2, respectivement. θ_1 est l'angle d'incidence, θ_2 l'angle de réfraction et θ_1' l'angle de réflexion. Les rayons incidents et réfractés sont en traits pleins, les rayons réfléchis en pointillés. **A.** $n_1 < n_2$: les rayons sont réfractés quels que soient leurs angles d'incidence. **B.** $n_1 > n_2$: le rayon bleu est exactement à l'angle critique, son rayon réfracté est orthogonal à la normale. Le rayon violet est au-delà de l'angle critique et n'est plus réfracté du tout.

Lorsque le rayon lumineux entre de façon perpendiculaire dans le nouveau milieu, il est réfracté avec un angle nul par rapport à la normale, et n'est donc pas dévié. Plus l'angle d'incidence θ_1 augmente, plus l'angle réfracté θ_2 augmente également. De plus, une partie du rayon incident est toujours réfléchi (Figure 34A). Un cas particulier se présente lorsque $n_1 > n_2$ (ex : passage du verre à l'air), à partir d'un certain seuil (appelé angle critique), le rayon incident ne pénètre plus du tout dans le second milieu et est réfléchi (Figure 34B). Toutefois, une partie du rayon incident est toujours réfléchi, avec un angle égal en valeur absolue à celui du rayon incident par rapport à la normale (eq. 8) (Figure 34B).

$$\theta_1 = -\theta_2 \tag{8}$$

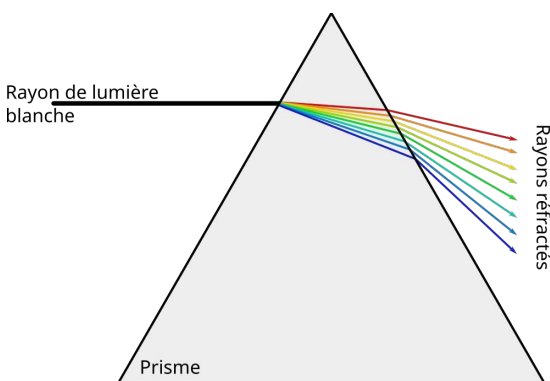


Figure 35: Décomposition de la lumière blanche par un prisme.

De plus, l'indice de réfraction d'un milieu dépend de la longueur d'onde (en dehors du vide pour lequel $n = 1$ pour toutes les longueurs d'onde) (eq. 5 ; 6). Par conséquent, chaque longueur d'onde va être réfractée avec un angle légèrement différent. Ainsi, la lumière blanche peut être décomposée par l'utilisation d'un prisme qui réfracte chaque longueur d'onde à un angle différent (Figure 35).

c. Lentilles et microscopie optique

Une lentille peut être convergente ou divergente, selon son effet sur les rayons lumineux. Une lentille est dite convergente lorsque les rayons lumineux parallèles à l'axe optique sont rabattus vers l'axe optique, en un point appelé point focal image (Figure 36A) ; tandis que l'on parle de lentille divergente lorsqu'ils sont déviés vers des points différents (Figure 36B). Le point focal image est alors virtuel, et situé en amont de la lentille (Figure 36B). Le point focal objet est le point de concours des rayons incidents, lorsque les rayons sortants sont parallèles à l'axe optique. Dans le cas d'une lentille convergente, il est réel et situé en amont de la lentille (Figure 36C), alors qu'il est virtuel et en aval de la lentille dans le cas d'une lentille divergente (Figure 36D) [Bellanger *et al.*, 2013].

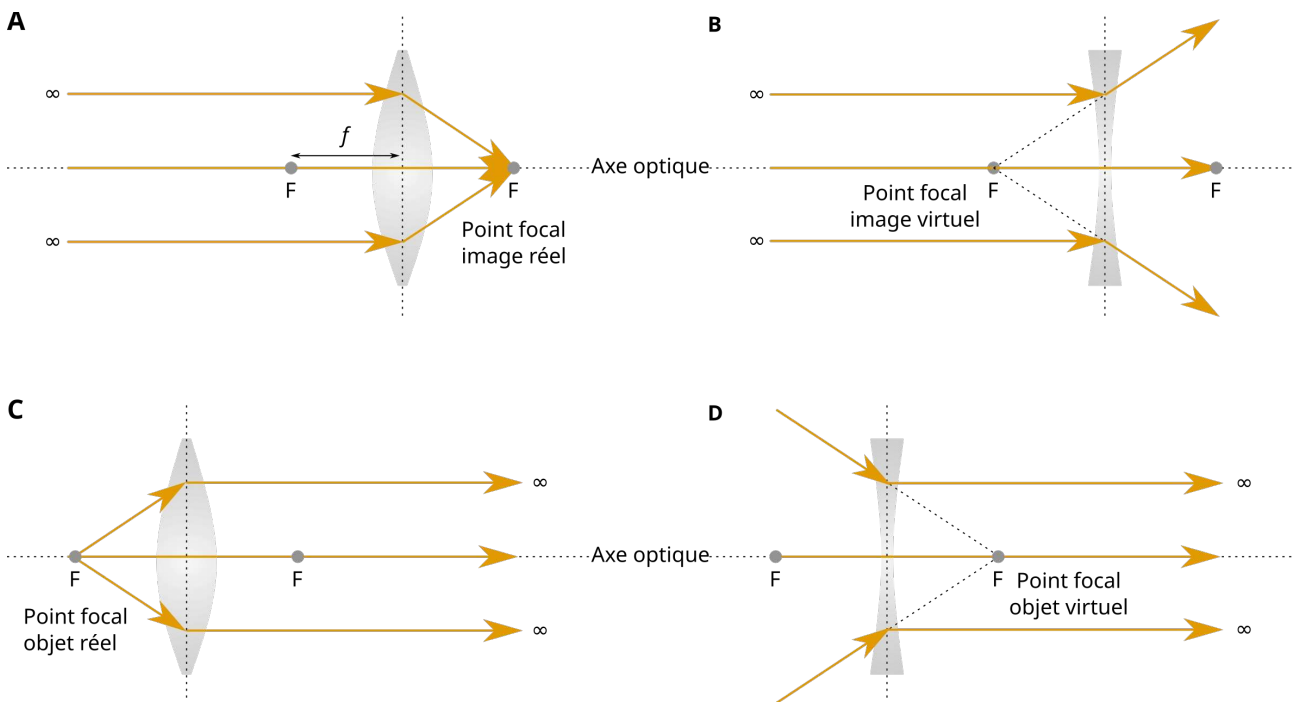


Figure 36: Lentilles convergente (A, C) et divergente (B, D). Le rayon passant par le centre de la lentille n'est pas dévié. Les points F sont les points focaux objets ou images de chaque lentille. f est la distance focale.

Tous les microscopes optiques fonctionnent grâce à des lentilles, et permettent d'agrandir l'angle sous lequel l'objet d'étude est observé. En effet, l'œil n'est pas sensible à la taille d'un objet, mais à l'angle sous lequel il le voit (Figure 37) [Acuité visuelle – Syndicat National des Ophtalmologistes de France]. C'est ce qui fait que les éléments lointains apparaissent petits. L'œil humain peut voir jusqu'à une limite d'environ $1'$ d'arc, soit 0.02° [Acuité visuelle – Syndicat National des Ophtalmologistes de France]. A 10 m cela correspond à un objet de 4 mm, mais à 25 cm (*punctum proximum*, le point le proche permettant une vision nette), cela correspond à un objet de $100\ \mu\text{m}$ (Figure 37).

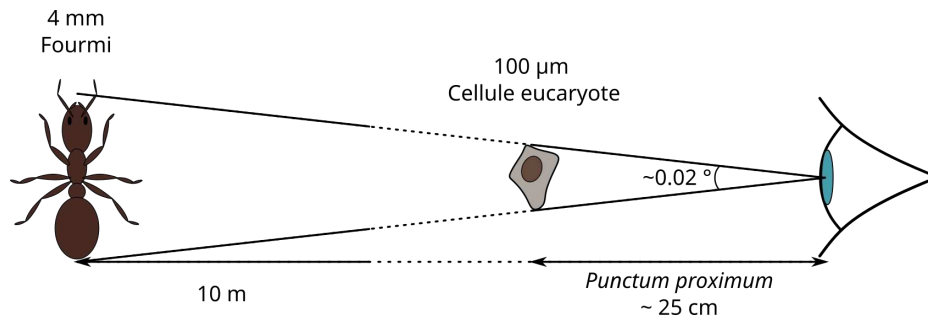


Figure 37: L'œil est sensible à l'angle sous lequel il voit les objets et non leurs tailles réelles.

Un microscope comprend au minimum un objectif, une lentille de tube et un oculaire (Figure 38). L'objectif, proche de l'échantillon permet de créer une image à l'infini de l'échantillon et, couplé à la lentille de tube, de générer le grossissement de base (eq. 9). L'image à l'infini créée par l'objectif est récupérée par la lentille de tube qui crée une image réelle au plan focal de l'oculaire. Ce dernier génère enfin une image à l'infini, visible par l'œil (Figure 38). L'oculaire permet un grossissement supplémentaire (eq. 10), généralement de 10X. Le grossissement total du microscope est le produit du grossissement de l'objectif couplé à la lentille de tube et de l'oculaire (eq. 11). L'objectif travaillant à l'infini en combinaison à la lentille de tube permet par ailleurs d'ajouter facilement des éléments optiques (filtres, polariseurs, miroirs, etc.) dans le chemin optique (Figure 38) [[Anatomy of the Microscope - Mechanical Tube Length | Olympus LS](#)].

$$G_1 = \frac{f_{tube}}{f_{obj}} \quad (9)$$

$$G_2 = \frac{d_{pp}}{f_{oc}} \quad (10)$$

$$G_{tot} = G_1 \times G_2 \quad (11)$$

avec f_{tube} , f_{obj} , et f_{oc} les distances focales de la lentille de tube, de l'objectif et de l'oculaire, respectivement ; et d_{pp} la distance du *punctum proximum*.

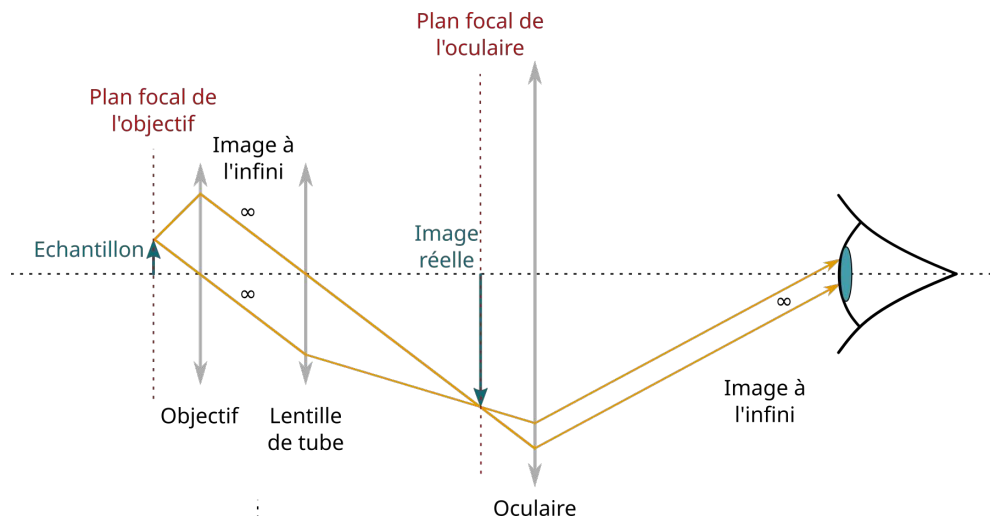


Figure 38: Fonctionnement d'un microscope. Les rayons lumineux sont représentés en orange, les lentilles en gris, l'échantillon et son image réelle en bleu, et les plans focaux en pointillés rouges.

3. Microscopie de fluorescence

a. Intérêts de la microscopie de fluorescence

En biologie, un défi de la microscopie est de créer du contraste afin de pouvoir observer correctement les structures d'intérêt. En effet, un grand nombre d'échantillons biologiques est transparent, la conséquence étant que les structures manquent souvent de contraste et sont donc peu visibles. Différentes techniques optiques permettent d'améliorer ce contraste en insérant des éléments spécifiques dans le chemin optique, comme c'est le cas du contraste de phase ou de contraste par différentiel d'interférence (DIC – *Differential Interference Contrast*). Cependant, ces techniques ne seront pas détaillées ici.

Une autre façon d'améliorer le contraste est de marquer l'échantillon. Une méthode de marquage particulièrement avantageuse est la fluorescence. En fluorescence, seuls les objets marqués vont émettre de la lumière, ce qui permet de travailler sur fond noir, maximisant ainsi le contraste. De plus, plusieurs couples longueurs d'onde d'excitation/détecteurs peuvent être utilisés en parallèle, permettant donc l'étude de plusieurs structures ou composés simultanément. Il existe une grande variété de fluorochromes, qui peuvent être organiques ou protéiques. Leur utilisation varie en fonction de l'objectif. Un fluorochrome (généralement organique) couplé à un anticorps permet par exemple de marquer une protéine pour étudier sa localisation. Toutefois, ce type de marquage nécessite la fixation de l'échantillon et ne permet donc pas d'études temporelles. Les ADN complémentaires codant pour des fluorochromes protéiques peuvent être intégrés au génome de

l'organisme d'étude, ou transfectés transitoirement, permettant alors le suivi d'un phénomène au cours du temps, potentiellement en réponse à une perturbation du système. La progression des techniques de microscopie permet également d'utiliser les marquages fluorescents pour de l'imagerie de très haute résolution. Les applications de la microscopie de fluorescence sont nombreuses et variées, et les quelques exemples donnés ici sont très loin de former une liste exhaustive des possibilités offertes par ce type de marquage.

b. Qu'est ce que la fluorescence ?

La fluorescence est la capacité d'une molécule (appelée fluorochrome) excitée par une onde lumineuse à réémettre de la lumière dans une longueur d'onde de plus faible énergie. Lorsque le rayon d'excitation va rencontrer une molécule fluorescente, celle-ci va passer dans un état singulet excité (Figure 39A). Pour revenir à son état fondamental, elle va soit se désexciter par conversion interne (sans émission de lumière), soit en émettant un photon de plus faible énergie. La différence d'énergie est dissipée par désexcitation non-radiative rapide des sous niveaux vibrationnels de l'état excité électronique, dont le temps de vie est d'environ 10^{-12} sec (Figure 39A). L'écart de longueurs d'ondes résultant est appelé décalage de Stokes (Figure 39). Plus le décalage de Stokes est important, plus les spectres d'excitation et d'émission sont séparés (Figure 39B). Pour qu'un fluorochrome soit adapté à la microscopie de fluorescence, il faut un décalage de Stokes minimum d'environ 20 nm, afin de pouvoir séparer spectralement les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. Durant l'état excité, le fluorochrome peut également passer dans un état quantique particulier dénommé l'état triplet. Ce dernier survient suite à une rotation de spin, aussi appelée conversion inter-système et peut être renforcé par un phénomène de couplage spin-orbite. Ces deux processus quantiques ne seront pas détaillés ici. Lorsque le fluorochrome est en état triplet, il peut se désexciter par conversion interne ou par phosphorescence (avec émission de lumière, mais à des durées beaucoup plus longues que la fluorescence ($>10^{-3}$ sec vs. 10^{-9} sec, respectivement)) (Figure 39A). Durant cet état triplet, le fluorophore tend à réagir avec le dioxygène, qui a la particularité d'être à l'état triplet à l'état fondamental. L'interaction triplet-triplet fait passer le dioxygène à l'état singulet (1O_2), extrêmement réactif (*cf.* Chapitre 1), et va oxyder les molécules environnantes, à commencer par le fluorochrome en question, entraînant ainsi son photoblanchiment définitif, caractérisé par une incapacité à être réexcité [Yuste, 2011].

Un fluorochrome est caractérisé par quatre paramètres principaux, les deux premiers étant ses spectres d'absorption et d'émission. Le troisième est le temps de vie de fluorescence (autour de 10^{-9} sec), c'est-à-dire la durée pendant laquelle le fluorochrome reste dans son état excité singulet, et

donc le temps nécessaire à l'émission de la fluorescence après l'excitation. Enfin le dernier paramètre est le rendement quantique (QY - *Quantum Yield*), correspondant au nombre de photons émis par ce fluorochrome par rapport au nombre de photons reçu lors de l'excitation (eq. 12). Il est défini comme le rapport entre le taux d'émission de fluorescence, et la somme des taux de tous les processus de désexcitation (radiatifs et non-radiatifs) (eq. 13) [Yuste, 2011].

$$QY = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} \quad (12)$$

$$QY = \frac{k_{flu}}{k_{flu} + k_{NR} + k_{CIS}} \quad (13)$$

où k_{flu} est le taux d'émission de fluorescence, k_{NR} est le taux de désexcitation non-radiative et k_{CIS} le taux de conversion intersystème. Plus le QY est élevé, plus le fluorochrome va être brillant adapté à l'utilisation en microscopie. Toutefois, la brillance d'une molécule fluorescente dépend également d'un second paramètre, le coefficient d'extinction molaire ϵ qui mesure la capacité d'un fluorochrome à absorber la lumière qu'il reçoit à une longueur d'onde donnée. Autrement dit, ce coefficient suit le spectre d'absorption de la molécule. Ainsi, la brillance d'une molécule est définie comme étant le produit du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire (eq. 14) :

$$B = QY \times \epsilon \quad (14)$$

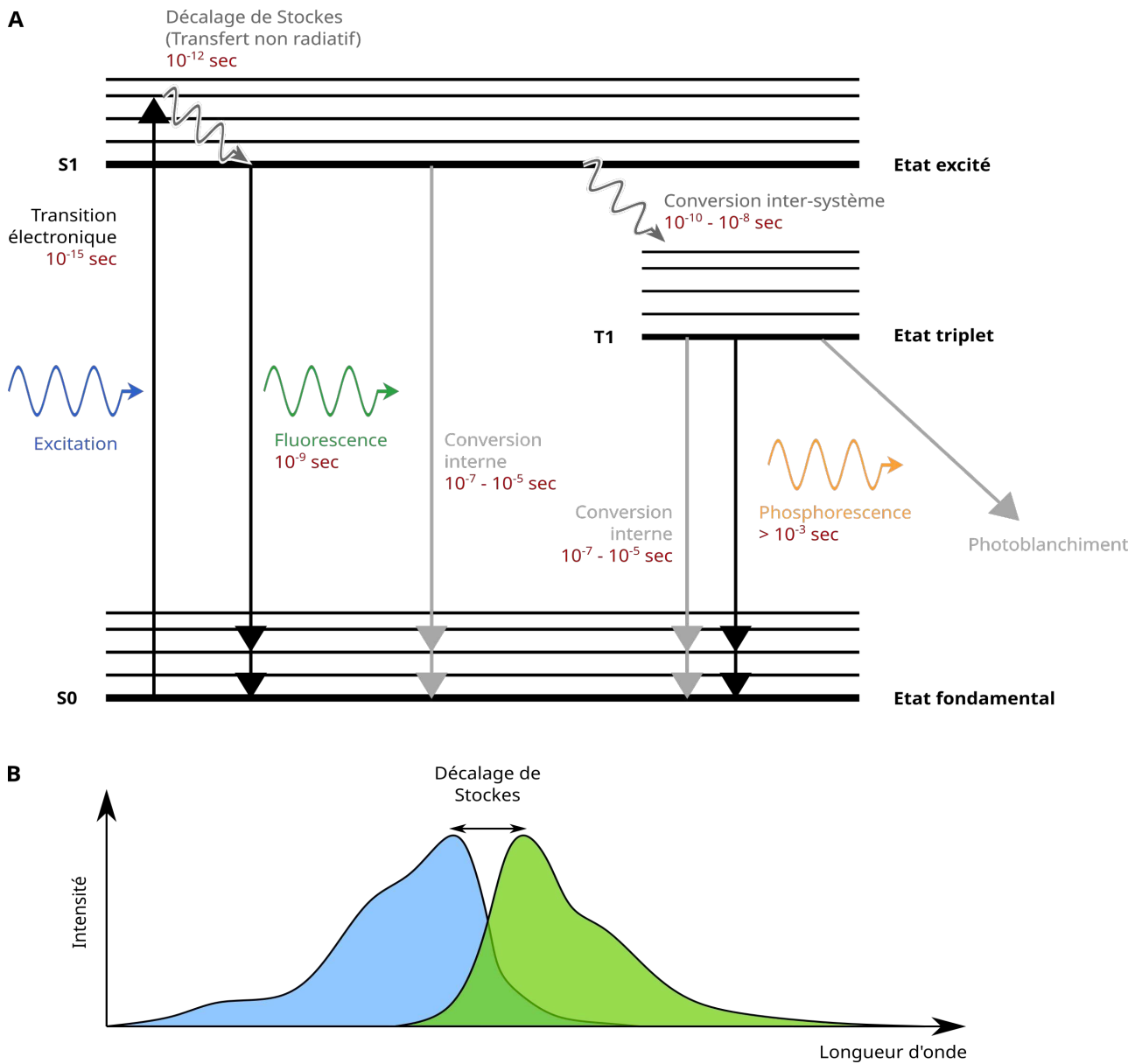


Figure 39: Fonctionnement de la fluorescence. **A.** Diagramme de Jablonski montrant le mécanisme de la fluorescence et des différents phénomènes connexes. Les temps caractéristiques de chaque phénomène est indiqué en rouge, et les phénomènes n'émettant pas de lumière en gris. **B.** Conséquence du décalage de Stokes sur les spectres d'absorption (bleu) et d'émission (vert) d'un fluorophore (fictif).

c. Résolution

Un deuxième défi de la microscopie, en plus de l'amélioration du contraste, est l'amélioration de la résolution spatiale du système. Elle dépend directement de la limite de diffraction du système [Abbe, 1874], qui elle même dépend de l'ouverture numérique (NA – *Numerical Aperture*) de l'objectif [Abbe, 1881]. La diffraction est un phénomène physique qui concerne tous les types d'ondes et apparaît lorsque le front d'onde est spatialement restreint (Figure 40A). En microscopie de fluorescence, c'est le cas de la lumière provenant de l'échantillon lorsqu'elle passe sur les bords de l'objectif, ce qui élargit le front d'onde et crée des décalages de phases des ondes lumineuses, et génère ainsi des interférences constructives et destructives [The Diffraction Barrier in Optical Microscopy – Nikon ; Yuste 2011]. Ce phénomène se traduit par le fait que l'image d'un objet infiniment petit est une tâche floue entourée d'anneaux, appelée tâche d'Airy ; la conséquence étant une incapacité à discriminer deux éléments proches (Figure 40B). La distance minimale d pouvant être résolue par le microscope est donnée par le critère de Rayleigh (eq. 15) [ZEISS Microscopy Online Campus | Microscopy Basics | Image Formation] :

$$d = \frac{\lambda}{2NA} \quad (15)$$

Ainsi, la taille de la tâche d'Airy, et donc la résolution du système dépendent directement de la longueur d'onde de la lumière d'excitation, et de l'ouverture numérique de l'objectif. Cette dernière prend en compte l'angle maximal θ des rayons collectés par l'objectif (Figure 40C) ainsi que l'indice de réfraction du milieu n (eq. 16).

$$NA = n \sin \theta \quad (16)$$

Par conséquent, plus la longueur d'onde est courte et plus l'ouverture numérique est grande, meilleurs sont la résolution et le grossissement ; la contrepartie étant une distance de travail plus petite et

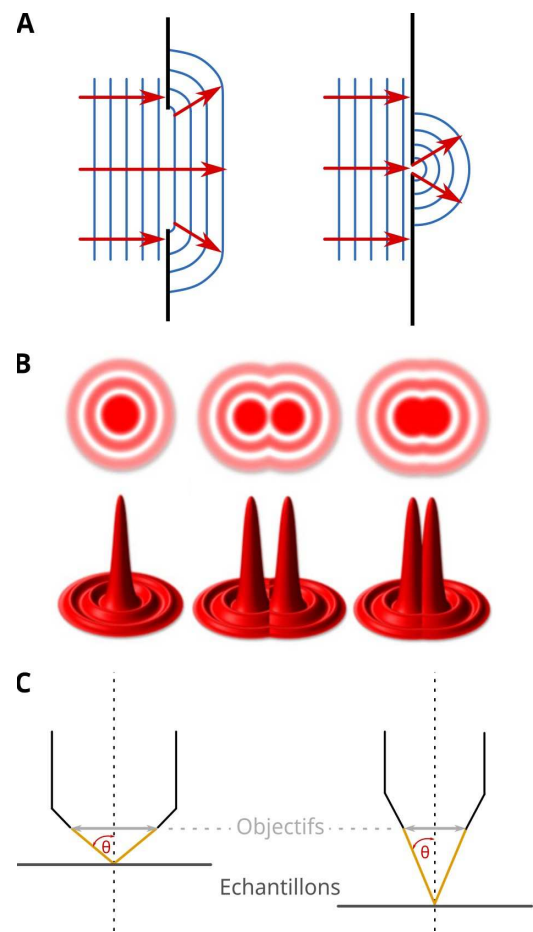


Figure 40: Diffraction et ouverture numérique. A. Phénomène de diffraction : le front d'onde est perturbé lorsque qu'il est spatialement contraint. B. Tâches d'Airy d'un seul (gauche) et de deux objets infiniment petits juste résolus (milieu) et non résolus (droite). Adapté de Zeiss Microscopy. C. Impact de la NA sur la distance de travail.

donc un risque accru d'endommager l'objectif à l'utilisation. La taille de la tâche d'Airy d'un objet infiniment petit est donc spécifique à chaque objectif et peut être utilisée pour mesurer la résolution de l'objectif en question [The Diffraction Barrier in Optical Microscopy – Nikon]. Par conséquent, un microscope optique classique n'est pas capable de distinguer deux objets séparés par une distance inférieure à la moitié de la longueur d'onde d'excitation, soit approximativement 200 nm pour un microscope à fluorescence [The Diffraction Limit of Light | Cherry Biotech ; Wilson, 2017].

d. Confocalité et sectionnement optique

Par ailleurs, en microscopie de fluorescence les fluorochromes vont être excités sur toute l'épaisseur de l'échantillon et donc émettre de la fluorescence provenant également d'en dehors du plan focal. Avec un microscope en champ large (WF – *Wide Field*, décrit jusqu'ici et également nommée microscopie à épifluorescence), toute la fluorescence est collectée, qu'elle vienne ou non du plan focal (Figure 41A). Afin de remédier à ce signal de fond qui réduit le contraste de l'image, les microscopes confocaux possèdent un *pinhole* (trou d'aiguille) placé devant le détecteur, au point où l'image réelle provenant du plan focal se forme, ce qui permet de restreindre le signal enregistré à celui provenant du plan focal uniquement (Figure 41B), mais n'autorise par conséquent de n'imager qu'un point, de la taille du pinhole et localisé le long de l'axe optique, à la fois. Les microscopes confocaux utilisent donc des lasers focalisés qui scannent le champ de vue grâce à des miroirs vibrants, illuminant un point après l'autre ; et des détecteurs points n'acquérant la lumière émise que point par point, au rythme de balayage du laser. Ils génèrent ainsi une image reconstruite ; à l'inverse des microscopes WF qui possèdent des caméras et acquièrent bien l'ensemble du champ de vue simultanément.

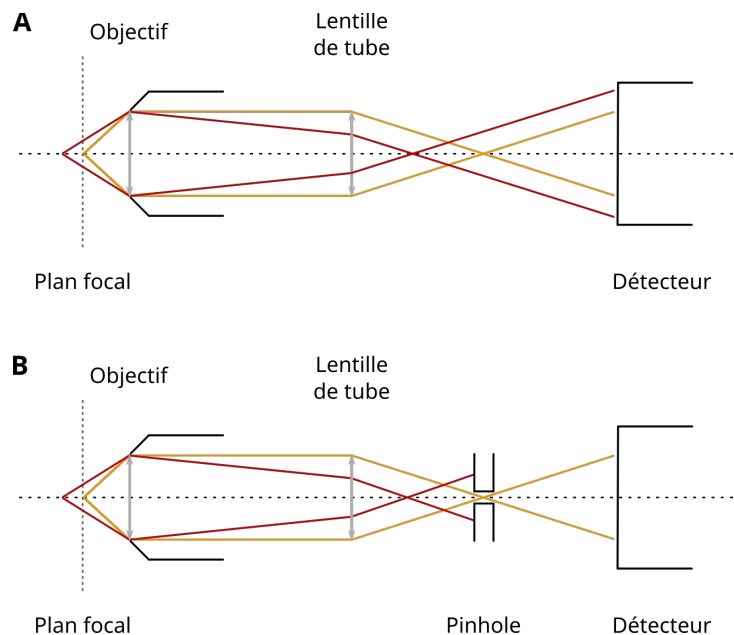


Figure 41: Comparaison d'un microscope WF (A) et Confocal (B). **A.** Schéma d'un microscope WF simplifié. Toute la fluorescence est collectée, qu'elle vienne du plan focal (orange) ou non (rouge) **B.** Schéma d'un microscope confocal simplifié. L'ajout d'un pinhole devant le détecteur permet de bloquer la lumière provenant hors du plan focal (rouge) sans bloquer celle venant du plan focal (orange).

Le fait de scanner le champ de vue au lieu de tout illuminer à la fois comme avec un microscope WF va également permettre de définir des sous-régions de ce champ de vue, permettant de ne pas nécessairement scanner l'ensemble, et donc selon les lasers et les puissances utilisées, de mettre en œuvre différentes techniques afin d'étudier, par exemple, des dynamiques de protéines.

II. Étude des dommages à l'ADN par microscopie de fluorescence

1. Micro-irradiation et induction de dommages

L'induction contrôlée de dommages au sein de l'ADN des cellules est essentielle à l'étude des mécanismes de réparation. L'ajout d'agents génotoxiques dans le milieu de culture a longtemps été et est toujours utilisé. Ils peuvent soit interagir directement avec l'ADN et ainsi l'endommager, comme c'est le cas du H_2O_2 [Linn, 1998 ; Birben *et al.*, 2012], le méthyle méthane sulfonate (MMS) [Wyatt & Pittman, 2006], ou le cisplatine [Riddell, 2018], soit bloquer des processus cellulaires qui mènent à l'induction de dommages. C'est par exemple le cas des inhibiteurs des topoisomérases qui vont induire des cassures simple et double-brin [Pommier, 2006 ; Pommier *et al.*, 2022]. Cependant, cette technique présente quelques inconvénients, en particulier pour l'étude de la dynamique des protéines impliquées, liés au manque de contrôle spatio-temporel de la durée du traitement. En effet, toutes les drogues ne pénètrent pas avec la même efficacité dans les cellules, et certaines doivent être métabolisées avant d'être actives. C'est par exemple le cas du bromate de potassium ($KBrO_3$), souvent utilisé pour induire des stress oxydants, qui doit être réduit par le glutathion avant de pouvoir induire des dommages dans l'ADN [Ballmaier & Epe, 1995]. Afin de contourner ces problèmes, depuis une quinzaine d'années, la micro-irradiation laser en cellules vivantes (Figure 42) est de plus en plus utilisée, permettant l'induction rapide et contrôlée de dommages dans l'ADN et donc l'étude de la dynamique des protéines de réparation. En effet, les cinétiques de recrutement et relargage des protéines impliquées peuvent être suivies par quantification de l'intensité de fluorescence dans la zone micro-irradiée en comparaison du reste du noyau (Figure 42).

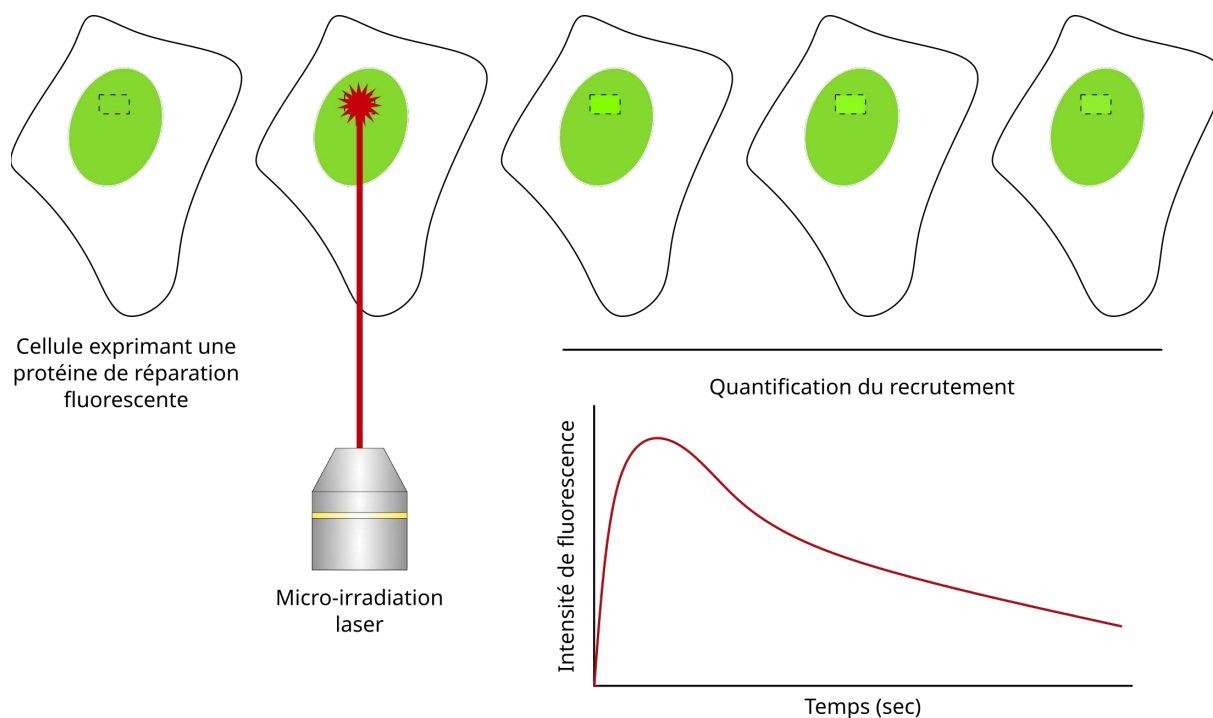


Figure 42: Représentation schématique de l'induction de dommages par micro-irradiation. La zone micro-irradiée est symbolisée par le rectangle en pointillés.

Selon la longueur d'onde du laser utilisé, son mode d'émission (continu ou pulsé), la puissance utilisée et l'utilisation ou non d'un photosensibilisateur, le type de dommages prédominant peut varier, favorisant ainsi l'étude de l'une ou l'autre des voies de réparation de l'ADN (Tableau 3) [Drexler & Ruiz-Gómez, 2015 ; Gassman & Wilson, 2015]. Les longueurs d'ondes les plus fréquemment utilisées pour induire des dommages dans l'ADN se situent principalement dans les UV (330-370 nm), les UV proches (405 nm) et les IR proches (750-800 nm) [Kong *et al.*, 2009 ; Gassman & Wilson, 2015]. Parmi ces dernières, l'utilisation de la micro-irradiation à 405 nm est la plus répandue, car c'est une longueur d'onde d'imagerie classique (imagerie du DAPI/Hoechst pour marquer l'ADN) fréquemment présente d'office sur les microscopes. A l'inverse les UV et IR ont généralement des chemins optiques spécifiques et sont souvent pilotés par des logiciels extérieurs ce qui fait que les configurations de microscopes les utilisant sont moins répandues [Gassman & Wilson, 2015]. La lumière visible, du violet au vert (435-532 nm), peut également être utilisée pour l'induction de dommages, mais son utilisation est rare [Kim *et al.*, 2005 ; Gassman & Wilson, 2015].

Comme mentionné plus haut, la micro-irradiation, en particulier lors de l'utilisation de laser à 405 nm ou de lumière visible, peut être couplée à l'ajout d'un photosensibilisateur (Tableau 3), ce qui permet d'une part d'abaisser le niveau d'énergie nécessaire à l'induction de dommages, mais également d'être plus spécifique en terme de lésions induites [Gassman & Wilson, 2015 ; Zentout *et*

al. 2021]. Les plus couramment utilisés sont le Hoechst 33342, un agent intercalant de l'ADN ; et le BrdU, un analogue de nucléotides, permettant principalement l'induction de cassures simple ou double-brin (Tableau 3) [Zentout *et al.*, 2021]. Dans le cas de l'induction de dommages oxydatifs, le Ro19-8022 été plus spécifiquement utilisé [Will *et al.*, 1999 ; Campalans *et al.*, 2013 ; Godschalk *et al.*, 2013 ; Møller *et al.*, 2018]. Son efficacité à produire ce type de lésions a principalement été démontrée en le combinant avec une exposition à la lumière, induisant ainsi des dommages sur l'entièreté du génome, de façon similaire aux drogues mentionnées plus haut [Will *et al.*, 1999 ; Godschalk *et al.*, 2013 ; Møller *et al.*, 2018] ; mais il a également été utilisé avec succès en combinaison avec une micro-irradiation laser à 405 nm [Campalans *et al.*, 2013] et 365 nm [Lan *et al.*, 2004].

Plus récemment, de nouvelles techniques ont été développées, permettant de cibler spécifiquement une région génomique, grâce à l'utilisation de fluorophores génétiquement encodés tels que la KillerRed (KR) [Bulina *et al.*, 2006], ou de protéines activant des fluorogènes (FAP – *Fluorogen Activating Proteins*) [He *et al.*, 2016]. La différence entre ces deux catégories de protéines est que la KR et ses dérivés émettent eux mêmes des ROS lorsqu'ils sont excités à la longueur d'onde adéquate ; tandis que les FAP nécessite qu'un fluorogène vienne les lier avant de pouvoir produire des ROS. Dans les deux cas, ces protéines peuvent être fusionnées à des protéines spécifiques, permettant ainsi de les adresser à des régions précises du génome, et donc d'induire des dommages dans une zone ciblée. Ces techniques ont ainsi été utilisées pour étudier le fonctionnement du BER au sein de l'hétérochromatine comparativement à l'euchromatine [Lan *et al.*, 2014] ou l'impact de la présence de 8-oxoG au niveau des télomères [Fouquerel *et al.*, 2019].

Tableau 3: Différents modes de micro-irradiation laser, et les types de dommages induits.

Longueur d'onde (nm)	Photosensibilisateur	Dommages	Références
337 pulsé	###	SSB ; DSB ; 6,4-PP ; CPD ; 8-oxoG	Kong <i>et al.</i> , 2009
	BrdU	DSB	Lukas <i>et al.</i> , 2003 ; Bekker-Jensen <i>et al.</i> , 2006 ; Kong <i>et al.</i> , 2009
365 pulsé	###	SSB	Lan <i>et al.</i> , 2004
	Ro19-8022	8-oxoG	Lan <i>et al.</i> , 2004
	BrdU	DSB	Singh <i>et al.</i> , 2021
405 continu	###	SSB ; DSB	Campalans <i>et al.</i> , 2013 ; Lan <i>et al.</i> , 2014 ; Campalans & Radicella, 2016 ; Etourneaud <i>et al.</i> , 2021
	Ro19-8022	8-oxoG	Campalans <i>et al.</i> , 2013
	Hoechst 33 342	SSB ; DSB	Smith <i>et al.</i> , 2019 ; Juhász <i>et al.</i> , 2020 ; Prokhorova <i>et al.</i> , 2021 ; Singh <i>et al.</i> , 2021
435 pulsé	###	SSB ; DSB	Solarczyk <i>et al.</i> , 2012
488 continu	###	SSB ; DSB	Berquist <i>et al.</i> , 2010
514 continu	Bromure d'éthidium	8-oxoG	Zarebski <i>et al.</i> , 2009
532 pulsé	###	SSB ; DSB ; 6,4-PP ; CPD	Kim <i>et al.</i> , 2005 ; Kong <i>et al.</i> , 2009
559 continu	Killer Red	SSB ; 8-oxoG	Lan <i>et al.</i> , 2014
768 pulsé	###	8-oxoG	Zielinska <i>et al.</i> , 2011
800 pulsé	###	SSB ; DSB ; 6,4-PP ; CPD ; 8-oxoG	Kong <i>et al.</i> , 2009 ; Singh <i>et al.</i> , 2021

2. Dynamique des protéines de réparation

Comme évoqué au chapitre sur la dynamique de recherche de cible au sein du noyau, les protéines liant l'ADN, dont font partie les protéines de réparation de l'ADN suivent un mode de diffusion particulier, la diffusion facilitée, ce qui leur permet d'être dans trois type de régimes possible : diffusion-limité, réaction-limité, ou un régime mixte [Michelman-Ribeiro *et al.*, 2009].

Différentes techniques de microscopie de fluorescence en cellules vivantes permettent d'étudier la dynamique de protéines d'intérêt, les trois principales étant le suivi de particule unique (SPT – *Single Particle Tracking*), le retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP – *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) et la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS – *Fluorescence Correlation Spectroscopy*).

a. Suivi de particule unique (SPT)

Cette technique est aussi vieille que l'étude des mouvements browniens, et c'est celle-là même qui fut utilisée par Jean Perrin pour vérifier le principe de la diffusion [Perrin, 1909 ; Phillips *et al.*, 2008]. De nos jours, les techniques de microscopie permettent de suivre des particules bien plus petites que les grains de pollen alors observés par Perrin, allant ainsi jusqu'au suivi de molécules uniques grâce à différents types de marquages spécifiques ou en l'alliant à des techniques de microscopie de super-résolution. Les marquages les plus utilisés de nos jours en biologie cellulaire car permettant la meilleure résolution spatio-temporelle sont les nanocristaux semi-conducteurs (ou *Quantum dots* en anglais), et les fluorophores organiques [Chang *et al.* 2008 ; Cognet *et al.*, 2014 ; Boujard *et al.*, 2012].

Le principe de cette technique est, comme son nom l'indique, de suivre des particules uniques au cours du temps, ce qui permet de reconstituer leurs trajectoires. A partir de là, le MSD, le type de mouvement (brownien, anomal, etc.) et d'autres paramètres peuvent être extraits, permettant de caractériser la dynamique de protéine d'intérêt et éventuellement le milieu dans lequel elle évolue [Wang *et al.*, 2021].

De plus, même si la résolution du SPT est soumise à la limite de diffraction, il est possible d'obtenir le positionnement des particules avec une précision de l'ordre de 10 nm, pour peu que les protéines suivies soient suffisamment espacées (~ 500 nm) [Braeckmans *et al.*, 2010]. En effet, du fait de la diffraction, les particules sont vues comme des taches dont le profil d'intensité suit une loi de Gauss. En utilisant les logiciels appropriés, il est alors possible de déterminer le centre du profil

d'intensité (donc le positionnement de la particule) avec une très bonne précision [Braeckmans *et al.*, 2010].

b. Retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

Le principe de base du FRAP est très similaire à celui de la micro-irradiation et tire avantage de la propriété des fluorophores, généralement plutôt considérée comme un inconvénient, à être photoblanchis. Au lieu d'induire des dommages dans l'ADN grâce à un laser dédié, c'est le laser d'excitation de la fluorescence qui est utilisé à forte puissance (sans photosensibilisateur) afin de photoblanchir localement les protéines fluorescentes (Figure 43) [Boujard *et al.*, 2012]. Du fait du mouvement dynamique des protéines d'intérêt, la fluorescence va revenir dans la zone blanchie et peut être quantifiée. La vitesse du retour de fluorescence dépend du régime sous-tendant la dynamique de la protéine étudiée. Ainsi, plus le retour de fluorescence est lent, plus la dynamique de la protéine étudiée est lente, quel que soit son régime de réaction/diffusion [Houtsmuller, 2005] (Figure 43). Plusieurs paramètres quant à la dynamique de la protéine étudiée peuvent être extraits des courbes, tels que la proportion de protéines immobiles ou le temps caractéristique de retour de fluorescence (Figure 43). Ce dernier correspond au temps nécessaire au retour de la moitié de la

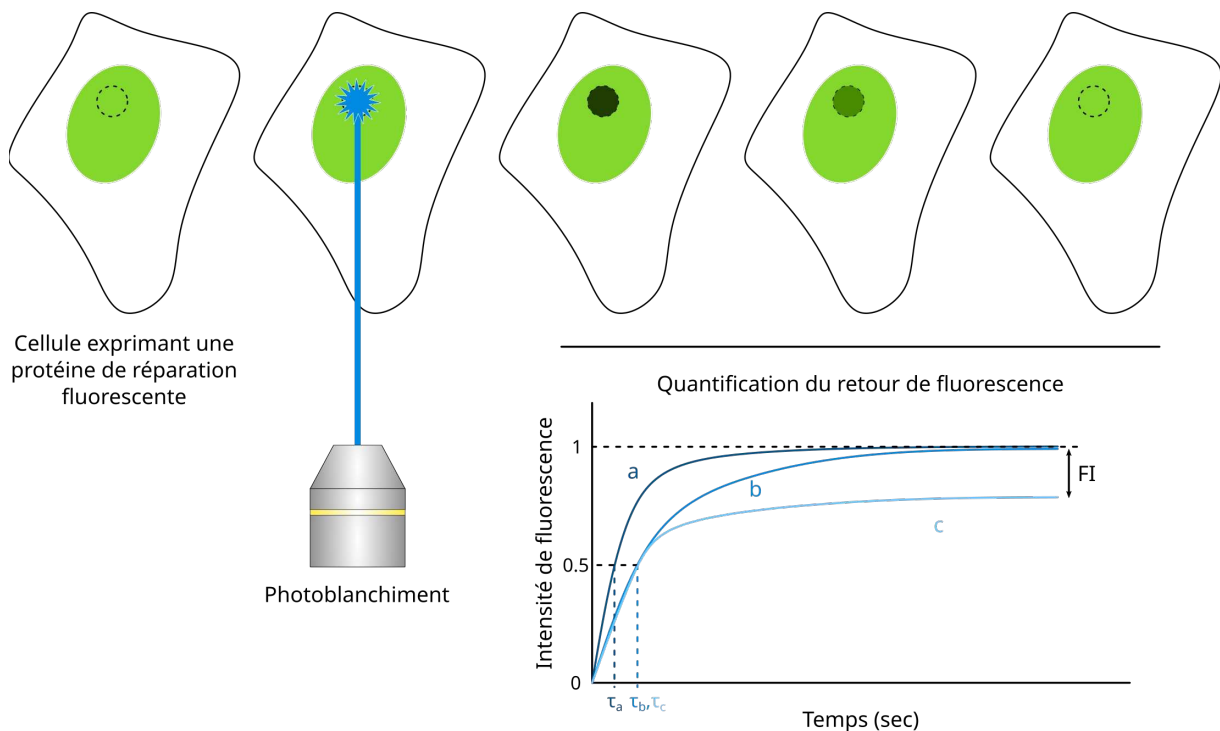


Figure 43: Représentation schématique d'une expérience de FRAP. La région photoblanchie est indiquée en pointillés. Une protéine dont la dynamique est rapide (a) aura un temps caractéristique (τ_a) de retour de fluorescence plus court qu'une protéine plus lente (b, c). De plus, une population de protéines dont une fraction est immobile (FI) mènera à un retour de fluorescence incomplet.

valeur initiale de fluorescence et peut être utilisé pour déterminer le coefficient de diffusion [Houtsmuller, 2005 ; Guo *et al.*, 2008]. Une absence de retour de fluorescence est caractéristique d'une protéine immobile aux temps d'observations (Figure 43) [Houtsmuller, 2005].

c. Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS)

La FCS est une technique permettant d'étudier les dynamiques rapides de molécules uniques. Pour cela, le laser d'imagerie est focalisé en un point de la cellule, et les fluctuations d'intensité de fluorescence résultant de la traversée du volume confocal par des protéines fluorescentes sont mesurées, l'entrée de l'une de ces dernières dans le volume confocal générant un pic de fluorescence, et la sortie d'une autre, s'accompagnant d'une diminution de la fluorescence (Figure 44). Chaque photon émis est compté individuellement, permettant de générer des traces de fluctuations de fluorescence brutes [Ries & Schwille, 2012]. Ces traces brutes peuvent alors être autocorrélées (eq. 17) afin d'obtenir une courbe d'autocorrélation dont sont dérivés plusieurs paramètres quantitatifs quant à la dynamique de la protéine d'intérêt.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \cdot \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (17)$$

où $G(\tau)$ est l'autocorrélation pour un un décalage temporel τ entre la courbe et elle-même, $\delta I(t)$ et $\delta I(t+\tau)$ étant la fluctuation d'intensité de fluorescence à l'instant t par rapport à la moyenne d'intensité, et la fluctuation d'intensité de fluorescence sur la durée $t+\tau$, respectivement, et les $\langle \dots \rangle$ symbolisent une moyenne [Schwille & Haustein, 2001].

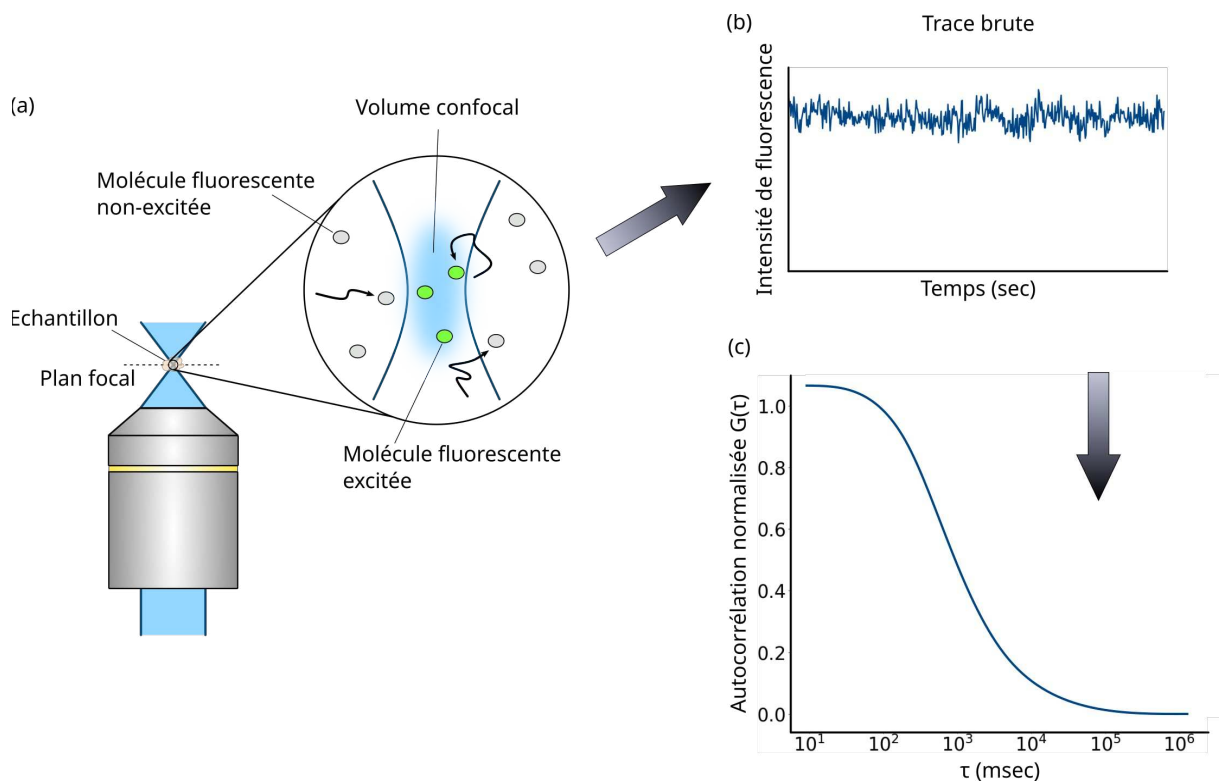


Figure 44: Principe de la FCS. Les fluctuations d'intensité de fluorescence émise par les protéines traversant le volume confocal (a) forment une trace brute (b) qui est ensuite autocorrélée (c).

L'autocorrélation mesure la similarité de la trace brute avec elle-même pour différents décalages temporels, et le temps de décorrélation permet d'obtenir le temps caractéristique de résidence des protéines dans le volume confocal en ajustant les données sur un modèle (eq. 18) [Ries & Schwille, 2012 ; Wachsmuth *et al.*, 2015], la courbe d'autocorrélation se décalant vers la droite au fur et à mesure que la dynamique de la protéine d'intérêt ralentit (Figure 45A).

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[1 + \left(\frac{\tau}{\tau_D} \right) \right]^{-1} \left[1 + \frac{1}{\kappa^2} \left(\frac{\tau}{\tau_D} \right) \right]^{-1/2} \quad (18)$$

où N est le nombre de molécules fluorescentes dans le volume confocal, τ est le décalage temporel considéré, τ_D est le temps caractéristique de diffusion, et κ est le facteur de forme et dépend du microscope. Il correspond au ratio entre le rayon court et le rayon long du volume confocal (de forme élipsoïdale).

De plus, la présence d'un ou plusieurs épaulements renseigne sur le type de dynamique de la protéine. Ainsi, une courbe ne présentant qu'un seul épaulement provient généralement d'une seule population de protéines ; tandis que la présence de plusieurs épaulements (Figure 45B) suggère que les protéines sont subdivisées en plusieurs populations présentant soit des modes de diffusion

différents (ayant différents D , ou 1D vs. 3D par exemples) ; soit, dans le cas d'un régime réaction-limité, l'une des populations (généralement la plus rapide) est diffusive, tandis que la seconde correspond à la fraction liée à l'ADN [Wachsmuth *et al.*, 2000 ; Schwille & Haustein, 2001 ; Michelman-Ribeiro *et al.*, 2009 ; Wachsmuth *et al.*, 2016]. Une dynamique anormale étant souvent caractéristique d'une situation intermédiaire, les courbes correspondantes ne vont présenter qu'un seul épaulement également, mais la pente de décorrélation sera plus faible que celle de la courbe d'une protéine purement diffusive (à temps caractéristiques de décorrélation égaux) (Figure 45C). La durée de vie de l'état triplet du fluorophore utilisé peut également être à l'origine d'un épaulement sur la courbe d'autocorrélation [Schwille & Haustein, 2001], mais il se situe généralement à des temps très courts, particulièrement en comparaison de ceux liés à la dynamique de DBP [Schwille & Haustein, 2001]. A l'inverse, la trace peut être affectée aux temps longs suite au photoblanchiment des fluorophores lorsque la protéine d'intérêt présente une dynamique lente, comme ça peut être le cas de DBP. Cet inconvénient a longtemps empêché d'étudier des protéines trop lentes en FCS, mais depuis quelques années, il est possible de pré-traiter les traces brutes pour corriger le photoblanchiment (ou toute autre composante affectant les traces de FCS, comme des mouvements cellulaires ou chromatiniens) [Wachsmuth *et al.*, 2015].

Par ailleurs, la FCS est la seule technique de microscopie permettant d'avoir accès au nombre absolu de molécules présentes dans le volume confocal à un instant t , ce nombre étant donné par l'inverse de l'amplitude de la courbe d'autocorrélation (*i.e.* l'ordonnée à l'origine) (Figure 45D) [Schwille & Haustein, 2001].

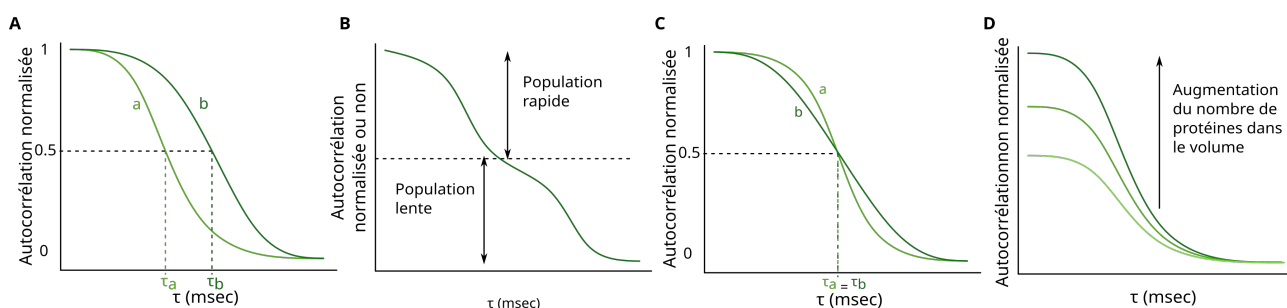


Figure 45: Principaux paramètres obtenus grâce à la FCS. A. Temps caractéristique de résidence dans le volume confocal (dépend directement de D). B. Nombre de populations de protéines. C. Différences entre courbes pure diffusion (a) et diffusion anormale (b) pour un même temps caractéristique de résidence. D. Nombre de protéines dans le volume confocal.

Ces approches de corrélation peuvent être déclinées sous différentes formes, telles que la corrélation pairée [Hinde *et al.*, 2014], la FCS en ligne [White *et al.*, 2016 ; Waithe *et al.*, 2018], couplée à des système de haute/super résolution comme la FCS-Airyscan [Scipioni *et al.*, 2018] ou le

STED-FCS [Mueller *et al.*, 2013], respectivement. Pour intéressantes qu'elles soient, ces techniques ne seront pas détaillées ici.

d. Comparaison et complémentarité des trois approches

Le SPT, le FRAP et la FCS sont trois approches différentes mais complémentaires permettant l'étude du mouvement des protéines. Chacune va sonder la dynamique de la protéine d'intérêt à des échelles de temps, de volumes et de concentrations différentes (Tableau 4). Le principal avantage du SPT est qu'il permet de suivre des particules individuelles observées directement, et donc d'avoir accès à leurs dynamiques individuelles [Guo *et al.*, 2008 ; Braeckmans *et al.*, 2010]. A l'inverse, la FCS et au FRAP mesurent tous deux la dynamique d'un ensemble de protéines, dans un volume de l'ordre du femtolitre pour une concentration maximale de quelques dizaines molécules par micromètre carré dans le cas de la FCS [Schwille & Haustein, 2001 ; Guo *et al.*, 2008], à plusieurs centaines voire milliers de molécules par micromètres carrés sur des surfaces de plusieurs micromètres carrés également pour le FRAP [Guo *et al.*, 2008 ; Braeckmans *et al.*, 2010]. Ces deux méthodes permettent de suivre la dynamique d'une population de protéines d'intérêt par l'intermédiaire de variations de fluorescence que l'on attribue *de facto* aux mouvements de ces protéines. Toutefois, ces variations peuvent avoir d'autres origines, comme des effets photophysiques des fluorophore ou l'instabilité du laser d'excitation, et ainsi fausser la mesure. Ces différentes sources de fluctuations du signal de fluorescence, indépendantes de la mobilité des protéines marquées, doivent être prises en compte dans les modèles d'analyse dans le cas où leur contribution ne peut pas être considérée comme négligeable ou corrigée par le traitement des données brutes. En termes de résolution temporelle, la FCS permet d'accéder à des dynamiques plus rapides, avec des temps caractéristiques de résidence pouvant aller de la microseconde à la milliseconde [Schwille & Haustein, 2001]. La résolution temporelle du SPT va dépendre de la vitesse d'acquisition du système, et se situe en général autour de la milliseconde [Boujard *et al.*, 2012]. Enfin, le FRAP est généralement utilisé pour des protéines dont le temps caractéristique de retour de fluorescence se situe entre quelques secondes et quelques minutes [Michelman-Ribeiro *et al.*, 2009].

Par ailleurs, les courbes obtenues par les trois méthodes nécessitent d'être ajustées sur un modèle afin de pouvoir extraire les paramètres caractéristiques de la dynamique de la protéine étudiée. Le choix du modèle utilisé est très important car il va définir l'interprétation des données et peut mener à des conclusions erronées s'il n'est pas approprié [Michelman-Ribeiro *et al.*, 2009 ; Wachsmuth *et al.*, 2016].

Tableau 4: Comparaison des trois techniques SPT, FRAP et FCS. D'après Guo *et al.*, 2008.

	Résolution spatiale (SPT) Surface sondée (FRAP, FCS)	Concentration	Échelles de temps
SPT	Résolution : ~ 10 nm	~ 0.1 molécules / μm^2	msec
FRAP	1 – 10 μm^2	100 – 1000 molécules / μm^2	sec – min
FCS	~ 0.2 μm^2	0.1 – 100 molécules / μm^2	μsec - msec

III. Conclusion du chapitre

Ce chapitre a permis d'introduire le fonctionnement de base d'un microscope, ainsi que les avantages que présente la microscopie confocale : la spécificité et le contraste du marquage grâce à la fluorescence et à l'ajout du pinhole. Le mode de fonctionnement d'un microscope confocal, permet également de ne scanner qu'une région du champ de vue, et donc de mettre en place des techniques de photomanipulation telles que le FRAP ou la micro-irradiation. Ainsi, les possibilités qu'offre la microscopie confocale à travers les techniques présentées ici en font un outil particulièrement indiqué pour l'étude de la réparation de l'ADN, quel que soit le dommage d'intérêt.

Objectifs de la thèse

La 8-oxoguanine (8-oxoG), forme oxydée de la guanine, et lésion pré-mutagène du fait de son affinité pour l'adénine, est reconnue et excisée par l'ADN-glycosylase OGG1, initiant ainsi la réparation par excision de base (BER). De nombreuses études *in vitro* et structurales se sont intéressées au fonctionnement de cette protéine, permettant d'élucider de façon assez fine le mécanisme de recherche et de reconnaissance, d'extrusion et de clivage de la 8-oxoG [Bruner *et al.*, 2000 ; van der Kemp *et al.*, 2004 ; Banerjee *et al.*, 2005 ; Blainey *et al.*, 2006, 2009 ; Rowland *et al.*, 2014 ; Shigdel *et al.*, 2020]. Ces données ont été accompagnées d'études en cellules qui ont permis de montrer qu'après un stress oxydant global, OGG1 était retenu à la fraction chromatiniennne, et que sa mobilité était réduite [Amouroux *et al.*, 2010 ; Campalans *et al.*, 2013]. Cependant, les études s'intéressant à la dynamique d'OGG1 en cellules vivantes sont très peu nombreuses, la phase de recherche de la lésion puis sa cinétique de recrutement étant de fait très mal caractérisées *in vivo*.

Le but de mon projet de thèse est donc d'étudier la dynamique d'OGG1 en cellules vivantes, et de comprendre quels sont les résidus impliqués à chaque étape, de la recherche de la 8-oxoG à son excision puis son relargage de la zone de dommages. Pour ce faire, différents mutants d'OGG1 ont été étudiés, certains déjà caractérisés *in vitro*, d'autres générés spécifiquement pour le projet, en se basant sur les structures connues d'OGG1. Plusieurs approches complémentaires ont été mises en œuvre, basées d'une part sur les techniques de microscopie décrites précédemment, et d'autre part sur des techniques de biochimie.

RÉSULTATS

I. Contributions différentielles des résidus d'OGG1 impliqués dans les étapes précoces d'investigation de l'ADN

Comme évoqué précédemment, les connaissances concernant la dynamique d'OGG1, aussi bien durant sa phase de recherche de la 8-oxoG, qu'après induction de dommages dans l'ADN sont encore assez parcellaires en cellules. Il en va de même pour un certain nombre de résidus de la protéine, pourtant suggérés comme jouant des rôles clés d'après les données de structure [Bruner *et al.*, 2000 ; Shigdel *et al.*, 2020]. Afin de mieux comprendre ces aspects du fonctionnement d'OGG1, la protéine sauvage et plusieurs mutants ponctuels d'OGG1 ont été étudiés. Ces données font l'objet d'un article actuellement en révision chez *Nucleic Acid Research* intitulé « **Identification of key residues of the DNA glycosylase OGG1 controlling efficient DNA scanning and recruitment to oxidized bases in living cells** », dont le manuscrit est joint ci-dessous. Il se divise en deux grandes parties : la première permet de valider les techniques utilisées (micro-irradiation, FRAP et FCS) grâce à des mutants d'OGG1 déjà caractérisés *in vitro* et pour lesquels on retrouve les résultats attendus ; la seconde applique ces méthodes à de nouveaux mutants, générés spécifiquement pour le projet.

Les mutants connus sont F319A, H270A et H270L, et présentent tous une affinité réduite pour la 8-oxoG et les sites AP [van der Kemp *et al.*, 2004]. Ils ont permis de montrer que la reconnaissance de la 8-oxoG par OGG1 n'était pas nécessaire pour la phase de recherche de la lésion, mais jouait un rôle important dans la capacité de l'ADN-glycosylase à s'accumuler à la zone de dommages. Ces résultats ont été confirmés grâce à l'utilisation d'un inhibiteur compétitif d'OGG1, le TH5487 [Visnes *et al.*, 2018], menant à des résultats similaires à ceux obtenus avec les mutants.

Par la suite, ces techniques ont été appliquées à de nouveaux mutants, le premier d'entre eux étant OGG1(G245A). Les données de structure suggéraient qu'il participait à l'établissement du contact entre OGG1 et l'ADN, et c'est en effet ce qu'on observe : la mutation de ce résidu abolit la capacité d'OGG1 à établir un contact stable avec l'ADN, empêchant complètement son recrutement aux dommages. Les deux mutants suivants sont OGG1(Y203A) et OGG1(N149A/N150A) (nommé 2NA pour plus de commodité). Y203 est supposé être l'acide aminé « sonde » initiant la détection de la 8-oxoG [Bruner *et al.*, 2000 ; Robey-Bond *et al.*, 2008 ; Dunn *et al.*, 2011], et travaillerait de concert avec les résidus N149 et N150 afin de permettre l'extrusion de la lésion [Bruner *et al.*, 2000 ; Shigdel *et al.*, 2020]. Cependant, les résultats montrent des effets radicalement différents pour les deux mutants, aussi bien en terme de dynamique que de cinétique après induction de dommages. La dynamique du mutant Y203A n'est pas perturbée, mais son recrutement est presque totalement aboli,

alors que le 2NA est extrêmement lent, recrute moyennement après micro-irradiation mais n'est pas relargué de la zone de dommages, indiquant son incapacité à exciser la lésion. Les résultats de microscopie pour ces trois mutants ont été consolidés par des expériences de biochimie (ce n'est cependant pas moi qui ai réalisé ces expériences).

Les figures principales ont été intégrées au texte, mais les données et matériels supplémentaires (figures et tableaux) sont placés à la fin de l'article. De plus, les numéros de figures, tableaux, équations et références sont indépendants du reste du manuscrit de thèse ; et les figures et tableaux de l'article ne sont pas référencés dans la liste présente au début du manuscrit.

Identification of key residues of the DNA glycosylase OGG1 controlling efficient DNA scanning and recruitment to oxidized bases in living cells

Ostiane D'Augustin^{1,2,3}, Virginie Gaudon⁴, Capucine Siberchicot^{2,3}, Rebecca Smith¹, Catherine Chapuis¹, Jordane Depagne^{5,6}, Xavier Veaute^{5,6}, Didier Busso^{5,6}, Anne-Marie Di Guilmi^{2,3}, Bertrand Castaing⁴, J. Pablo Radicella^{2,3}, Anna Campalans^{2,3*} and Sébastien Huet^{1,7*}

¹ Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) - UMR 6290, BIOSIT (Biologie, Santé, Innovation Technologique de Rennes) - UMS 3480, US 018, F-35 000 Rennes, France

² Université de Paris-Cité, CEA/IBFJ/IRCM. UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, F-92 260 Fontenay-aux-Roses, France

³ Université Paris-Saclay, CEA/IBFJ/IRCM. UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, F-92 260 Fontenay-aux-Roses, France

⁴ CBM, CNRS, UPR4301, Orléans France

⁵ Université de Paris-Cité, Inserm, CEA/IBFJ/IRCM/CIGEx, UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, F-92 265, Fontenay-aux-Roses, France

⁶ Université Paris-Saclay, Inserm, CEA/IBFJ/IRCM/CIGEx, UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, F-92 265, Fontenay-aux-Roses, France

⁷ Institut Universitaire de France, Paris, France

*Corresponding authors: Anna Campalans (anna.campalans@cea.fr) and Sébastien Huet (sebastien.huet@univ-rennes1.fr)

ABSTRACT

The DNA-glycosylase OGG1 oversees the detection and clearance of the 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), which is the most frequent form of oxidized base in the genome. This lesion is deeply buried within the double-helix and its detection requires careful inspection of the bases by OGG1 via a mechanism that remains only partially understood. By analyzing OGG1 dynamics in the nucleus of living human cells, we demonstrate that the glycosylase constantly scans the DNA by rapidly alternating between diffusion within the nucleoplasm and short transits on the DNA. This scanning process, that we find to be tightly regulated by the conserved residue G245, is crucial for the rapid recruitment of OGG1 at oxidative lesions induced by laser micro-irradiation. Furthermore, we show that residues Y203, N149 and N150, while being all involved in early stages of 8-oxoG

probing by OGG1 based on previous structural data, differentially regulate the scanning of the DNA and recruitment to oxidative lesions.

INTRODUCTION

DNA bases can be oxidized by reactive oxygen species arising from intracellular metabolism or external stresses. Due to its low oxidative potential (1), guanine is the most frequent target for oxidation among the different bases, leading to the formation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG). This base modification, which has been associated with various cancers and age-related diseases (2–5), promotes G:C to T:A transversions due to its ability to pair with adenine through its syn conformation (6). It is therefore crucial to efficiently clear 8-oxoG from the genome to avoid accumulation of mutations. In mammals, 8-oxoG facing a cytosine is recognized and excised by the 8-oxoguanine DNA-glycosylase 1 (OGG1) (7–10), hence initiating the base excision repair (BER) pathway (11, 12).

Unlike many other DNA lesions, 8-oxoG does not induce helix distortion nor blockage of either transcription or replication (13–16). Therefore, to efficiently detect and excise 8-oxoG, OGG1 needs to constantly scan the DNA through mechanisms not yet completely characterized. Structural data have revealed different conformations of the OGG1/DNA complex that could correspond to consecutive steps of this base inspection process (17–19). The binding of OGG1 to DNA leads to a local kinking of the DNA (20), which in turn promotes the flipping-out of the base for further inspection and potential cleavage. While it is unclear whether extrusion occurs irrespectively of the oxidation state of guanine, recent data suggest that only 8-oxoG is stabilized in this extra-helical position which facilitates the entry of the modified base into the OGG1 catalytic pocket (19). Importantly, we still miss a full cartography of the OGG1 amino-acid residues involved in these early steps of 8-oxoG detection. Residues such as the Y203 or N149 (in all this work, the residue numbering refers to the human OGG1) were shown to be important for intrahelical lesion sensing or for specificity towards the 8-oxoG:C pair (17, 19), but other conserved residues localized further away from the extruded base could also participate to these probing steps.

Besides these elementary molecular steps of the recognition of 8-oxoG by OGG1, the mechanisms regulating the exploration of the nuclear environment by OGG1 to ensure rapid detection of the oxidized guanines remain unclear. *In vitro* data demonstrated that OGG1 is able to diffuse along the DNA while searching for 8-oxoG (21), these DNA scanning phases probably alternating with periods of free diffusion to travel from one genomic location to another (22).

Although this search process is thought to be impacted by the wrapping of the DNA around histones (23), the dynamics of OGG1 within the nucleus remains poorly characterized (24).

In this work, we establish fluorescence-based assays to quantitatively characterize the dynamic behavior of OGG1 in the nucleus of living cells. Combining microscopy and biochemistry approaches, we were able to determine how conserved residues of OGG1 thought to be involved at early steps of lesion recognition impact the navigation of the glycosylase within the nucleus and its accumulation onto 8-oxoG induced by laser micro-irradiation.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids

All plasmids used in this study are listed in Table S1. The following plasmids were previously described: APE1-GFP (25), GFP2 and GFP5 (26). All OGG1 plasmids refer to the α isoform of human OGG1. For all the fluorescently tagged OGG1 constructs, a linker (translation PDPSGAAAAGGSQK) was inserted between OGG1 and EGFP in the plasmid previously described (27). Briefly, original OGG1-GFP plasmid was amplified by PCR with Phusion DNA polymerase using primers bringing the linker sequence (Table S2) using previously described method (28). Upon amplification, the PCR product was treated overnight with DpnI at 37°C to digest the original plasmid, and transformed in DH5 α -T1R home-made competent cells. Point mutations in OGG1-L1-GFP were generated using site-directed mutagenesis with primers listed in Table S2. To generate the GST-OGG1 fusion proteins, the wild-type and OGG1 (G245A) coding sequences were amplified by PCR with Phusion DNA polymerase (NEB) (primers indicated in Table S2) and PCR products were cloned in pnEAvg-based plasmids (29) by complementary single-strand annealing cloning (30). Upon amplification, PCR products were purified on GeneJet PCR purification kit (Thermo Fisher Scientific) to remove all dNTPs. The pnEAvg plasmid was digested by NdeI + BamHI. DNA molecules were treated with T4 DNA polymerase to generate complementary single strands. Upon annealing, the reaction was transformed in DH5 α -T1R home-made competent cells. For the generation of the plasmids coding for the His-tagged OGG1, OGG1 sequence was PCR amplified from pPR71 (8) cloned into NdeI/EcoRI sites of the overexpression vector pET30a (Novagen). The recombinant pET30a-hOGG1 was used as a template to introduce Y203A and N149A/N150A (referred to as 2NA) substitutions using the Quick-Change kit (Agilent) using primers indicated in Table S2. All constructs were validated by DNA sequencing. Restriction enzymes and DNA

polymerases were from New England Biolabs, antibiotics from Sigma-Aldrich and primers from Eurogentec.

Cell lines and treatments

The HeLa OGG1 knockout cell lines were generated according to the protocol described by the Zhang lab (31). The target sequence for OGG1 was chosen according to the web-based CRISPR design tool CRISPick (<https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public>). The sgRNA oligos (Table S2) were introduced into pX458 expressing Cas9 nuclease fused to GFP (Addgene #48 138). pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid #48 138). HeLa WT cells were transfected with the guide containing plasmid using the transfection reagent XtremeGENE HP (Roche) according to manufacturer's protocol. Single GFP positive cells were sorted into 96-well plates using the FACSAria Fusion flow cytometer (BD Biosciences). The knockout cell lines grown from the single cells were screened by western blot using an antibody against OGG1 (Abcam, ab124741). Cells were cultured in DMEM (Thermo Fisher Scientific) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Eurobio) and 1% of penicillin and streptomycin (PS) (Thermo Fisher Scientific) at 37°C with 5% CO₂. Cells were plated in chambered coverglass (Zell Kontakt or Thermo Fisher Scientific) and transfected with the indicated plasmid 48 to 72 hrs prior to imaging using X-Treme gene HP (Roche) transfectant reagent according to the manufacturer's instructions. Immediately before imaging, growth medium was replaced with gas-balanced phenol red-free Leibovitz L-15 imaging medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 20% FBS and 1% PS. TH5487 (Probecem, PC-35 806) and O8-Cl (Tocris) were added at 30µM in the imaging medium 20 to 30 mins prior to imaging. Fresh imaging medium containing O8-Cl was renewed every 2 hrs due to the low stability of this compound.

Immunostaining

To validate the induction of 8-oxoG by laser micro-irradiation, a dozen of cells was micro-irradiated and immediately fixed on ice with cold methanol and acetone (1:1), air dried, and rehydrated in PBS. DNA was denatured with 2N HCl for 45 mins, neutralized with Tris-HCl pH 8.8 for 5 min and washed three times in PBS. Then, cells were permeabilized with PBS-Triton 0.1% and incubated in blocking buffer (BSA 3%, Triton 0.1% in PBS) for 1 hr. All these steps were performed at room temperature (RT). Cells were incubated at 4°C overnight with an anti-8-oxoG mouse antibody (Abcam, ab48508) used at 0.6 µg/mL in blocking buffer. After three consecutive washing in PBS-Triton 0.1% for 10 mins, cells were incubated at RT for 1 hr with an anti-mouse secondary antibody tagged with AlexaFluor488 (Thermo Fisher Scientific, A11001) used at 2 µg/mL in blocking buffer.

DNA was stained for 10 min at RT with Hoechst in PBS (10µg/mL). Cells were rinsed 3 times and transferred in PBS for imaging. For the colocalization experiments, cells expressing unfused GFP2 or OGG1-GFP were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at RT and DNA was stained with Hoechst as described above.

Protein purification

To obtain protein extracts from WT and OGG1 KO cells, frozen cells (approx. 5×10^6 cells) were resuspended in 100 µL of lysis buffer (25 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA), sonicated for 10 s on ice (1s pulses with 10s intervals, using a Branson digital sonicator, power set to 10%) and centrifuged 90 mins at 14 000 rpm and 4°C. Protein concentrations of the supernatants were determined by the Bradford method (BioRad).

Plasmids pnEAvG-HsOGG1a and pnEAvGHsOGG1-G245A coding for the GST-OGG1 WT and GST-G245A proteins, respectively, were transformed into *E. coli* BL21(DE3). Bacteria were grown at 37°C to reach $OD_{600} = 1$ when 0.5mM IPTG was added and the cultures switched to 20°C for 18 h. Cells were harvested, suspended in lysis buffer (20mM Tris at pH 8 and 4°C, 500mM NaCl, 0.1% NP40, 2mM EDTA, 2mM DTT, 10% glycerol, 1 mg/mL Lysozyme, 1mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride, 10mM Benzamidine, 2µM pepstatine, 2µM leupeptine) and disrupted by sonication. Extract was cleared by centrifugation at $186.000 \times g$ for 1 h at 4°C and then incubated at 4°C with Glutathione Sepharose™ 4B resin (GE Healthcare) for 3h. The mixture was poured into an Econo-Column Chromatography Column (BIO-RAD) and the beads were washed with buffer A (20mM Tris at pH 8 and 4°C, 500mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM DTT, 10% glycerol) followed by buffer B (20mM Tris at pH 8 and 4°C, 100mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM DTT, 10% glycerol). GST fusions were eluted with Buffer B containing 30 mM glutathion. Fractions containing GST-protein were pooled and loaded to a 6 mL Resource S column (GE Healthcare) equilibrated with buffer B. The protein was eluted with a 90 mL linear gradient of 0.1–0.5 M NaCl. Peak fractions containing purified GST-OGG1 were pooled and glycerol was added to reach a final concentration of 50%. The His-tagged WT OGG1 and the mutated versions Y203A and 2NA were produced and purified as previously described (32). The 6-His-Tag of the protein of interest was eliminated by enterokinase digestion. The resulting proteolysate was applied onto a benzamidin column (GE Healthcare) to eliminate enterokinase and then onto a HisTrap™ (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.6, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM Imidazole and 1 mM DTT. The untagged protein eluted in the flow-through was then loaded on POROSTM HS20 cation exchanger equilibrated in buffer C (20mM Hepes pH7.6, 5% glycerol, 1mM DTT) and eluted with a linear NaCl

gradient with buffer D (= buffer C + 1M NaCl). Elution fractions containing the untagged protein were pooled and the homogenous protein was finally isolated by size-exclusion chromatography onto a Superdex 75 column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.6, 350 mM NaCl, 5% glycerol and 1 mM TCEP, concentrated at about 200 μ M and stored at -80°C .

Electrophoretic mobility shift assay

The ability of the OGG1 variants to bind the oligonucleotides indicated in Table S2 was analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Cy5 labelled DNA duplexes containing a G:C or an 8-oxoG:C pair used at 5 nM were incubated with increasing concentrations of OGG1 (G245A vs WT) for 30 min at 4°C in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 115 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.06 mg/mL BSA, 0.6 mM DTT, 7.5% Glycerol. The other variants (Y203A and 2NA vs WT) were studied as described previously (33). Briefly, 0.1 nM of 5'-[^{32}P]-labeled 24-mer DNA duplexes [G:C] or [8-oxoG:C] were incubated at 4°C for 30 min, alone or in the presence of the indicated protein concentrations, in 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.6, 100 mM NaCl, 10% Glycerol, 0.1% BSA and 0.5 mM TCEP. Binding reactions were loaded onto a non-denaturing 10% polyacrylamide gel for electrophoresis as described previously (34). After electrophoresis (14V/cm at 4°C), dried gels were exposed for autoradiography using a Typhoon Molecular Imager (Amersham) and quantified using ImageQuant software. Triplicate EMSA titration experiments were performed to extract apparent dissociation constants K_{Dapp} which is close to the enzyme concentration needed for half-maximal binding under the experimental conditions chosen (34). We used the Origins software (version 9.0.0, OriginLab) to fit the curves of the relative amounts of DNA/protein complex (C) as a function of the protein concentration (P) with a non-linear regression logistics function according to Hill equation:

$$C = C_{\text{max}} \frac{P^n}{K_{\text{Dapp}}^n + P^n} \quad (1)$$

where C_{max} is the maximal amount of DNA/protein complex, K_{Dapp} is the apparent dissociation constant and n is the Hill coefficient.

OGG1 DNA glycosylase activity

An oligonucleotide containing an 8-oxoG annealed with the complementary strand (Table S2) was used to evaluate OGG1 DNA glycosylase activity of HeLa WT or OGG1 KO protein extracts and proteins purified from *E. coli*. Total protein extracts or GST-tagged OGG1-WT and OGG1-G245A purified proteins, were incubated with 180 fmoles of the Cy5-labelled oligonucleotide at 37°C

in a final volume of 30 μ L of reaction buffer (25 mM Tris pH 7.5, 80 mM NaCl, 1 mM EDTA) for 15 mins or as indicated. Reactions were stopped by adding 2 μ L of 1.5 M NaOH and further incubated for 15 mins at 37°C to cleave the remaining abasic sites. 4 μ L of formamide loading buffer was added before heating 5 min at 95°C. The DNA glycosylase activity of the other purified mutants was measured using 20 nM of 5'-[³²P]-labeled 24-mer [8-oxoG:C] incubated at 37°C for 15 mins, alone or in the presence of indicated concentrations of OGG1 (WT, 2NA or Y203A) in TBE (1X) containing 150 mM NaCl and 0.1% BSA. The reaction was stopped by 5 min incubation with 0.2 M NaOH at 50°C followed by 3 mins incubation with formamide dye loading buffer at 75°C. Substrate and products were separated by electrophoresis on a 20% denaturing polyacrylamide gel (urea-PAGE: 19:1 acrylamide/bisacrylamide in TBE1X and 7 M urea) for 30 mins at 400 V. Gel autoradiography was performed using a Typhoon Molecular Imager (Amersham) and quantified using ImageQuant software.

Fluorescence imaging and correlation spectroscopy

All imaging experiments were performed on a LSM 880 Zeiss confocal microscope equipped with a water-immersion C-Apo 40X/1.2 NA. Hoechst and GFP/AF488 were excited using 405 nm and 488 nm lasers, respectively. Fluorescence was collected between 420-470 nm for Hoechst, and 500-550 nm for GFP and AF488, both on the GaAsP detector. Laser power used for imaging was adjusted to minimize photobleaching. Pixel sizes were ranging between 50 and 100 nm depending on the experiments. For live-cell experiments, cells were maintained at 37°C using a heating chamber.

To generate local 8-oxoG lesions by micro-irradiation, cell nuclei were irradiated once within a region of interest (ROI) of 80-pixel wide and 5-pixel high with a Ti:Sapphire femtosecond infrared laser (Mai Tai HP, Spectra Physics) which emission wavelength was set to 800 nm. Protein recruitment at sites of micro-irradiation was monitored by timelapse acquisitions at 1.6 Hz for approximately 90s.

For the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments, GFP-tagged constructs were bleached within a given ROI of the nucleus using 5 iterations of the 488 nm laser set at full power and the fluorescence recovery was imaged for 10 to 25s at 13 Hz acquisition speeds using a pixel size of 208 nm. For the FRAP within the DNA damage region, the same area was bleached before and approximately 10 seconds after micro-irradiation. DNA damage was induced within a ROI of 55 by 25 pixels as described above and the FRAP ROI was either a 15-pixel wide circle or a 16-pixel wide square within the micro-irradiation ROI.

For the fluctuation correlation spectroscopy (FCS) experiments, single photons emitted by GFP-tagged proteins were counted on the GaAsP detector in photon-counting mode. Each acquisition lasted 30 seconds to minimize noise on the autocorrelation curves. They were performed before micro-irradiation and approximately 10s after damage induction.

Image analysis

All image quantifications were performed using Fiji. For the colocalization analysis, Pearson's correlation coefficients between the two channels were computed using the Coloc 2 Fiji plugin (<https://imagej.net/plugins/coloc-2>). For each cell, the Pearson's coefficient was estimated within a manually chosen area encompassing each nucleus. To quantify protein recruitment at sites of damage, mean fluorescence signals were measured within the micro-irradiated area (I_{MIA}), the whole nucleus (I_{Nuc}) and in a background region (I_{BG}). The intensities with the irradiated area were corrected from background and imaging photobleaching, and normalized to the mean intensity prior to laser micro-irradiation as follows :

$$I_{recruit} = \frac{I_{MIA} - I_{BG}}{I_{Nuc} - I_{BG}} \times \left\langle \frac{I_{Nuc} - I_{BG}}{I_{MIA} - I_{BG}} \right\rangle_{predamage} \quad (2)$$

From these intensity measurements, peak recruitment values were extracted. For each acquisition, the peak intensity was considered to be the mean of all the values equal or above 95% of the absolute maximum. Peak recruitment values were estimated within the first 30 sec following damage induction. The retention of fluorescently tagged OGG1 mutants at the sites of damage was compared to that of WT OGG1 using the following metric (Fig S1A). From the recruitment curves of untreated WT OGG1, we estimated the mean time of the recruitment peak (t_{max}) as well as the mean time at which half of this peak is dissipated ($t_{1/2}$). Then, the relative residual intensity at sites of damage is estimated at $t_{1/2}$ for the different conditions as follows:

$$Res = \frac{I_{recruit}(t_{1/2}) - 1}{I_{recruit}(t_{max}) - 1} \quad (3)$$

where $I_{recruit}(t_{1/2})$ and $I_{recruit}(t_{max})$ are the recruitment intensities estimated at $t_{1/2}$ and t_{max} , respectively.

To analyze the FRAP acquisitions with variable sizes of photobleaching area, the intensities within the bleached region were corrected for background and imaging photobleaching similarly as what was done to quantify recruitment intensities. For the FRAP at DNA lesions, the intensities were measured in two neighboring regions both located within the micro-irradiated area: the bleached region and an unbleached reference region (Fig S1B). After background subtraction, the

ratio between the intensity in the bleached and reference regions was estimated. Then, for all FRAP analysis, we subtracted the signal estimated immediately after the bleach and normalized the intensities to the pre-bleach signal. These normalized FRAP curves were fitted with the following model :

$$I(t) = (1 - F_{imm}) \times \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right) \quad (4)$$

with F_{imm} the immobile fraction and τ the characteristic recovery time (35).

Analysis of the fluorescence correlation spectroscopy data

Raw time traces were autocorrelated using the Fluctuation Analyzer 4G software after detrending for slow fluctuations using a detrending frequency of 0.125 Hz (36). When characterizing the exploration dynamics of WT OGG1 within the nucleus, the autocorrelation curves were fitted with the following diffusion model (26):

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[1 + \left(\frac{\tau}{\tau_D} \right)^\alpha \right]^{-1} \left[1 + \frac{1}{\kappa^2} \left(\frac{\tau}{\tau_D} \right)^\alpha \right]^{-1/2} \quad (5)$$

where N is the number of fluorescent protein within the confocal volume, τ_D is the characteristic residence time within the confocal volume, α is the anomalous parameter and κ is the structural parameter, which was fixed to 6. α was either fixed to 1 to fit the curves with a simple diffusion model or left free for the fitting with the anomalous diffusion model. When comparing the dynamics of different OGG1 constructs, the curves were fitted with a simple diffusion model (α fixed to 1) to estimate their relative residence times within the confocal volume.

Statistics

Statistics, figures and quantification post-treatments were performed using python home-made routines. Statistics were performed using the statannot (<https://pypi.org/project/statannot/>) module from python. For the recruitment, FRAP and FCS curves, median \pm SD are shown. Unless stated otherwise, all experiments were performed in at least three independent replicates and when data from a single experiment is shown they correspond to a representative replicate. For the boxplots, the bold line indicates the median value, the box limits correspond to the 25th and 75th percentiles and the whiskers extend 1.5 times the interquartile range. p values were calculated with an independent t-test when comparing the Pearson's coefficients, with the Wilcoxon test when comparing the acquisitions pre and post DNA damage within the same nuclei, and with the Mann-

Whitney test when comparing different conditions within a given experiment. On the boxplots, * refers to $p < 0.05$, ** to $p < 0.01$, *** to $p < 0.001$, **** to $p < 0.0001$ and ns to non significant.

RESULTS

OGG1 alternates between transient binding to DNA and free diffusion when exploring the nuclear space in the absence of external stress

In vitro data have shown that OGG1 dynamically scans naked DNA during its search for 8-oxoG (21, 37). Nevertheless, it is less clear how OGG1 explores the dense environment of the nucleus in which DNA is packed within a highly folded chromatin structure. To analyze the behavior of OGG1 in living cells, we expressed wild-type (WT) OGG1 (or point mutants later in this report) fused to GFP in HeLa cells where the endogenous OGG1 gene was knocked-out (KO) by CRISPR/Cas9 (Fig S2A,B). First, we monitored the dynamics of OGG1 within the nucleus using Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS), a method which allows protein motions to be characterized at high time-resolution (26). Based on the estimation of its residence times within the confocal volume, OGG1-GFP appeared much slower than two purely diffusive tracers: a GFP dimer (GFP2) and a GFP pentamer (GFP5) (Fig 1A). As these two tracers have respectively similar or larger molecular masses than OGG1-GFP, the low OGG1 mobility cannot be explained by differences in molecular sizes unless OGG1 is part of a larger complex. Nevertheless, this hypothesis seems unlikely given that, based on the Stokes-Einstein law (38, 39), this complex would need to have a molecular mass as large as 60 MDa to account for the 10-fold lower mobility observed between GFP2 and OGG1-GFP.

Putting aside size differences, the most likely interpretation of the relative slow dynamics of OGG1 compared to diffusive tracers of similar sizes is that the DNA glycosylase not only diffuses within the nucleoplasm but also transiently binds DNA, thus reducing its overall mobility. This is supported by *in vitro* data showing the dynamic association of OGG1 with oligonucleotides even in the absence of 8-oxoG (21). Consistently, we observed significant colocalization between OGG1-GFP and Hoechst-stained DNA on confocal images (Fig 1B). Because basal levels of 8-oxoG are present in the nucleus even in the absence of external stress, we asked whether the binding of OGG1 to DNA was related to the specific detection of the lesion, or rather reflected how OGG1 explores the nucleus by alternating 3D diffusion with transient association with DNA independently of its oxidation status. To address this question, we compared the nuclear dynamics of GFP-tagged WT OGG1 with that of mutated fusions harboring the F319A or H270A substitutions (Fig 1C), both of which lose the

ability to bind 8-oxoG *in vitro* (40). The absence of a difference in residence time between the WT and the two mutant forms of OGG1 led us to conclude that the DNA-binding events displayed by OGG1 do not rely on specific recognition of 8-oxoG but rather correspond to the constant scanning of the DNA when searching for lesions.

Proteins that alternate between 3D diffusion in the nucleoplasm and transient association with DNA can follow three different regimes (41). In the first one, often referred to as a reaction-limited regime, diffusion between two binding sites can be considered as infinitely fast compared to the lifetime of the bound state, which is then the only parameter controlling protein dynamics. Conversely, in a diffusion-limited regime, the bound state is much shorter than diffusive transit between two binding sites. Finally, similar lifetimes between the bound and diffusive states would result in a mixed regime. To assess which regime better describes the behavior of OGG1 in the nucleus, we first performed fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments. The fact that the characteristic recovery time increased with the size of the bleached area (Fig 1D,E) implies that the dynamics of OGG1-GFP did not solely rely on the lifetime of the bound state but also on the progressive redistribution of the protein within the bleached area due to diffusion. This is incompatible with a reaction-limited regime (42). Next, if OGG1-GFP followed a diffusion-limited regime, we should be able to fit the FCS curves obtained for this protein with a simple diffusion model, similar to what can be done for a purely diffusive tracer such as GFP2 (Fig S2C) (43). However, the FCS traces acquired for OGG1-GFP could not be properly fitted with a simple diffusion model but rather required the use of an anomalous diffusion model (Fig 1F). This anomalous behavior discards the diffusion-limited regime and suggests that OGG1 proteins exploring the nuclear space rather follow a mixed regime for which the characteristic duration of the transient association with undamaged DNA to detect potential 8-oxoG lesions is within the same order of magnitude than the 3D diffusive transits between two binding events.

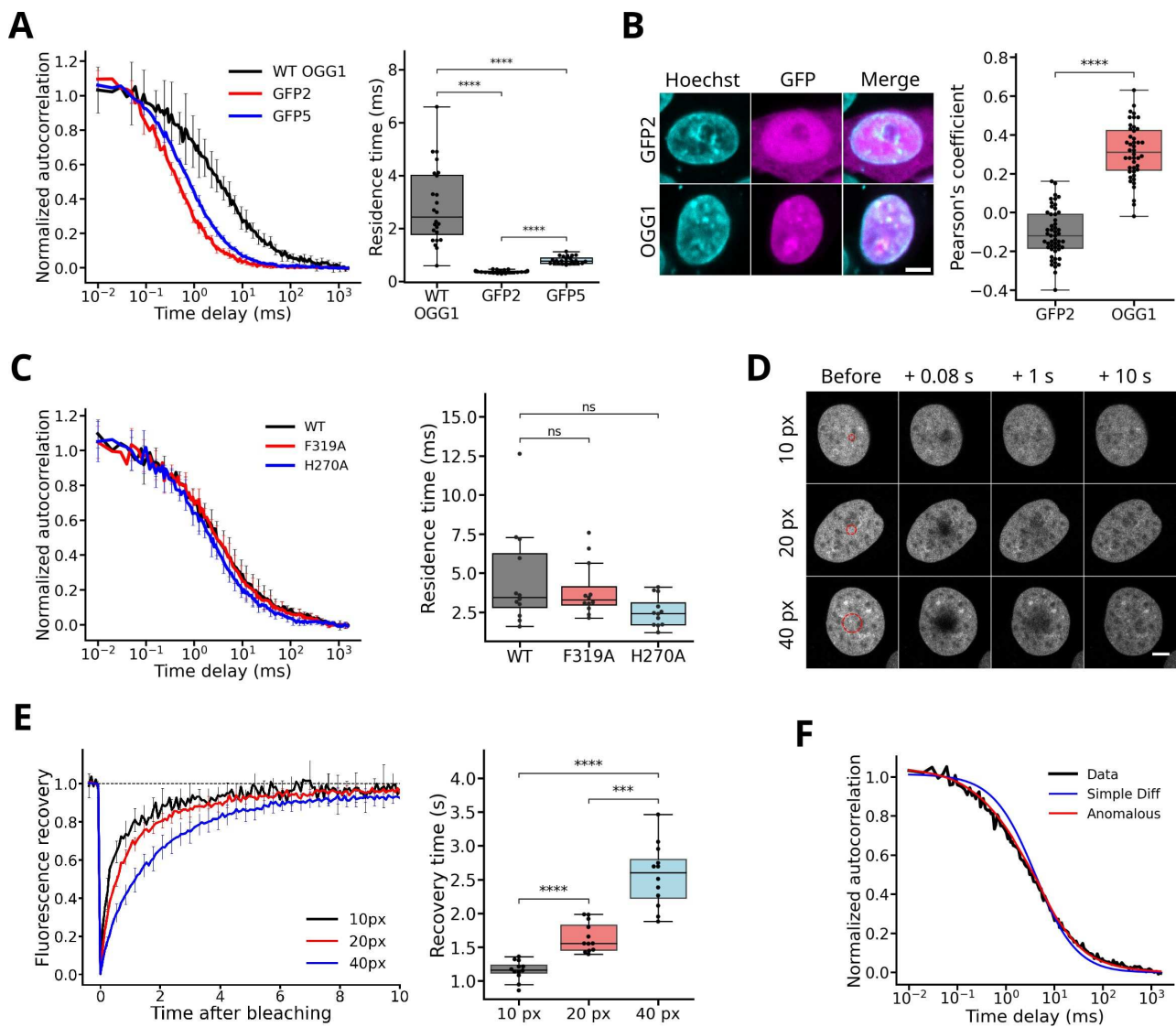


Figure P1: OGG1 dynamically scans the DNA within the cell nucleus (A) Left: Normalized FCS autocorrelation curves obtained for WT OGG1-GFP, a GFP dimer (GFP2) and a GFP pentamer (GFP5) expressed in HeLa OGG1 KO cells. Right: Residence times of the GFP-tagged constructs within the focal volume estimated from the fit of the autocorrelation curves. 12 cells per condition. **(B)** Left: Representative confocal images of HeLa OGG1 KO cells expressing either WT OGG1-GFP or a GFP dimer (GFP2) and counterstained with Hoechst. Scale bar: 10 μ m Right: Colocalization between the GFP and Hoechst channels estimated by calculation of the Pearson's coefficients (44 cells for OGG1-GFP, 50 cells for GFP2) **(C)** Left: Normalized FCS autocorrelation curves obtained for GFP-tagged WT OGG1, OGG1-F319A and OGG1-H270A expressed in HeLa OGG1 KO cells. Right: Residence times of the GFP-tagged constructs within the focal volume estimated from the fit of the autocorrelation curves. 12 cells per condition. **(D)** Representative time-course images of the fluorescence recovery after photobleaching of circular area of variable sizes within the nucleus of HeLa OGG1 KO cells expressing WT OGG1-GFP. The bleached regions with diameters of 10, 20 and 40 pixels are shown with red dashed circles. Scale bar: 5 μ m. **(E)** Left: Normalized fluorescence recovery curves for WT OGG1-GFP obtained from the images shown in D. Right: Characteristic recovery times estimated from the fit of the curves. 12 cells per condition. **(F)** Normalized autocorrelation curve obtained for WT OGG1-GFP expressed in HeLa OGG1 KO cells. Median of 12 cells. The experimental curve (black) is fitted either with a simple diffusion model (blue) or an anomalous diffusion model (red).

The efficient recruitment of OGG1 to laser-induced 8-oxoG relies on the direct recognition of the lesion by the DNA glycosylase

After assessing its dynamics in the absence of external stress, we characterized the spatio-temporal behavior of OGG1 upon acute induction of 8-oxoG. We set up a micro-irradiation protocol based on the use of an 800-nm femtosecond pulsed laser, which generated 8-oxoG locally within the nucleus of HeLa cells, as confirmed by immunofluorescence staining (Fig 2A). The accumulation of OGG1-GFP at sites of damage started immediately after irradiation, with a peak recruitment at about 10 s post irradiation and was followed by a slower dissipation phase lasting a few minutes (Fig 2B). We wondered whether OGG1 proteins accumulating at sites of damage were stably bound to the lesions or kept exchanging with a diffusive pool. The rapid fluorescence recovery observed after photobleaching of a sub-region of the recruitment area revealed that the association of OGG1 with DNA at sites of damage is highly dynamic (Fig 2C,D). This recovery was nevertheless slower than prior to damage induction with a longer characteristic recovery time as well as a larger non-recovering fraction (Fig 2D), indicating that the glycosylase accumulation at the irradiated area was correlated with a tighter binding of OGG1 to DNA. This was also supported by probing the local mobility of OGG1-GFP before and after laser irradiation using FCS, which revealed a longer residence time of the glycosylase in the focal volume after damage induction (Fig 2E).

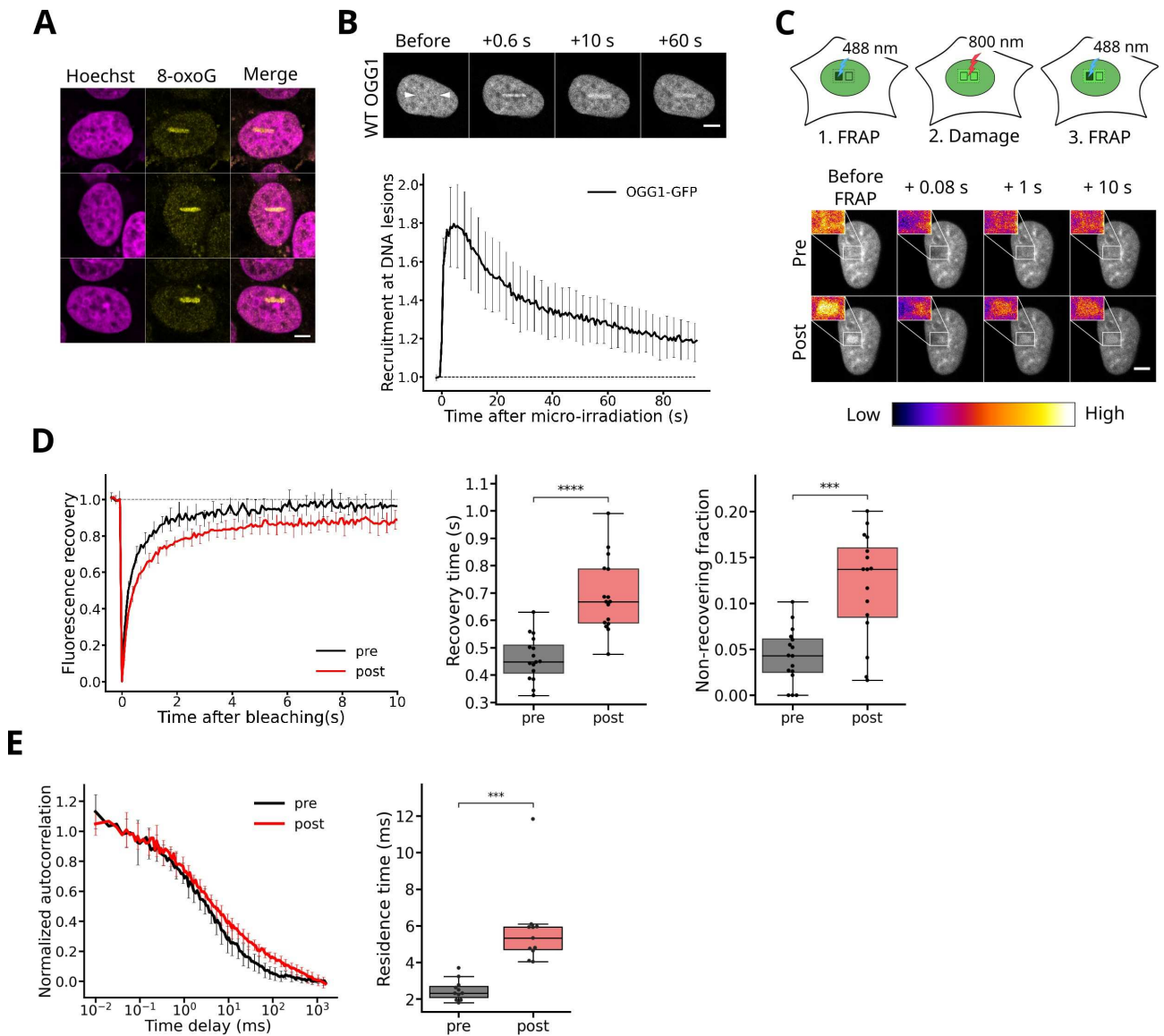


Figure P2. OGG1 is rapidly recruited to 8-oxoG lesions induced by laser micro-irradiation and displays rapid turnover at sites of damage. (A) Representative confocal images of HeLa OGG1 KO after laser micro-irradiation and immunostaining against 8-oxoG. DNA was counterstained with Hoechst. Scale bar: 5 μm (B) Top: Representative time-course images of the accumulation of WT OGG1-GFP at sites of laser micro-irradiation in the nucleus of OGG1 KO cells. White arrowheads indicate the micro-irradiated line. Scale bar: 5 μm . Bottom: Curve of the recruitment kinetics of WT OGG1-GFP at sites of micro-irradiation measured from the time-course images. Median of 12 cells. (C) Representative time-course images of the fluorescence recovery after photobleaching within the nucleus of HeLa OGG1 KO cells expressing WT OGG1-GFP before damage (pre) and at sites of laser micro-irradiation (post). Insets in pseudocolor show a magnified view of the micro-irradiated region. Scale bar: 5 μm . (D) Left: Normalized fluorescence recovery curves for WT OGG1-GFP before and after damage induction derived from the images shown in C. Right: Characteristic recovery times and immobile fractions estimated from the fits of the fluorescence recovery curves. 16 cells before and after damage. (E) Left: Normalized FCS autocorrelation curves measured for WT OGG1-GFP before damage (pre) and at sites of laser micro-irradiation (post) in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells. Right: Residence times of WT OGG1-GFP within the focal volume estimated from the fit of the autocorrelation curves. 11 cells before and after damage.

This rapid accumulation of OGG1 at sites of damage could rely on the recognition of 8-oxoG by the glycosylase itself but also involve other unknown 8-oxoG binding factors that OGG1 would associate with. To assess the specific contribution of the direct association of OGG1 with 8-oxoG to the recruitment process, we analyzed the behavior at sites of micro-irradiation of the OGG1-F319A and H270A mutants, which both show very low affinity for 8-oxoG *in vitro* (40). Albeit not fully abrogated, the accumulation of these two mutants was significantly reduced compared to WT (Fig 3A,B), in line with the need for a direct recognition of 8-oxoG by the glycosylase for efficient recruitment. Because these mutants have lost affinity for 8-oxoG but are still able to bind to apurinic/aprimidinic (AP) sites (40), we asked whether their residual recruitment at the sites of DNA damage could be due to their binding to AP sites generated by the laser irradiation concomitantly to 8-oxoG. We found that the endonuclease APE1, which processes AP sites, was recruited to the sites of damage as early as OGG1 (Fig S3A), suggesting that laser irradiation produced AP sites. In addition, the differences in peak recruitment between the three OGG1 mutants F319A, H270A and H270L (Fig S3A,B), which all lost ability to bind 8-oxoG, correlated with their decreasing affinity for the AP-site analog THF (40). These two findings suggest that the accumulation observed for WT OGG1 within the irradiated area is partially due to the presence of AP-sites, which could also explain the incomplete abrogation of the recruitment of the OGG1 mutants unable to bind to 8-oxoG. In addition to the analysis of protein recruitment, we also assessed protein dynamics at sites of laser irradiation by FCS. In contrast to what was observed for WT OGG1, we found no change in the local mobility for OGG1-F319A nor H270A compared to undamaged conditions (Fig 3C), consistent with their reduced affinity for the lesions generated at sites of laser micro-irradiation.

To confirm our conclusions derived from the use of OGG1 mutants, we also analyzed the impact of the OGG1 competitive inhibitor TH5487 (44, 45), on the recruitment of the glycosylase to sites of DNA damage induced by laser micro-irradiation. In line with the fact that TH5487 binds to the active site of OGG1, thus precluding association of the glycosylase with 8-oxoG, we observed a significant reduction in OGG1 accumulation to sites of damage in cells treated with this inhibitor (Fig 3D,E). These results are fully consistent with those obtained with the OGG1 mutants F319A and H270A, and demonstrate that the direct recognition of 8-oxoG by OGG1 is crucial for the rapid accumulation of the glycosylase to DNA lesions.

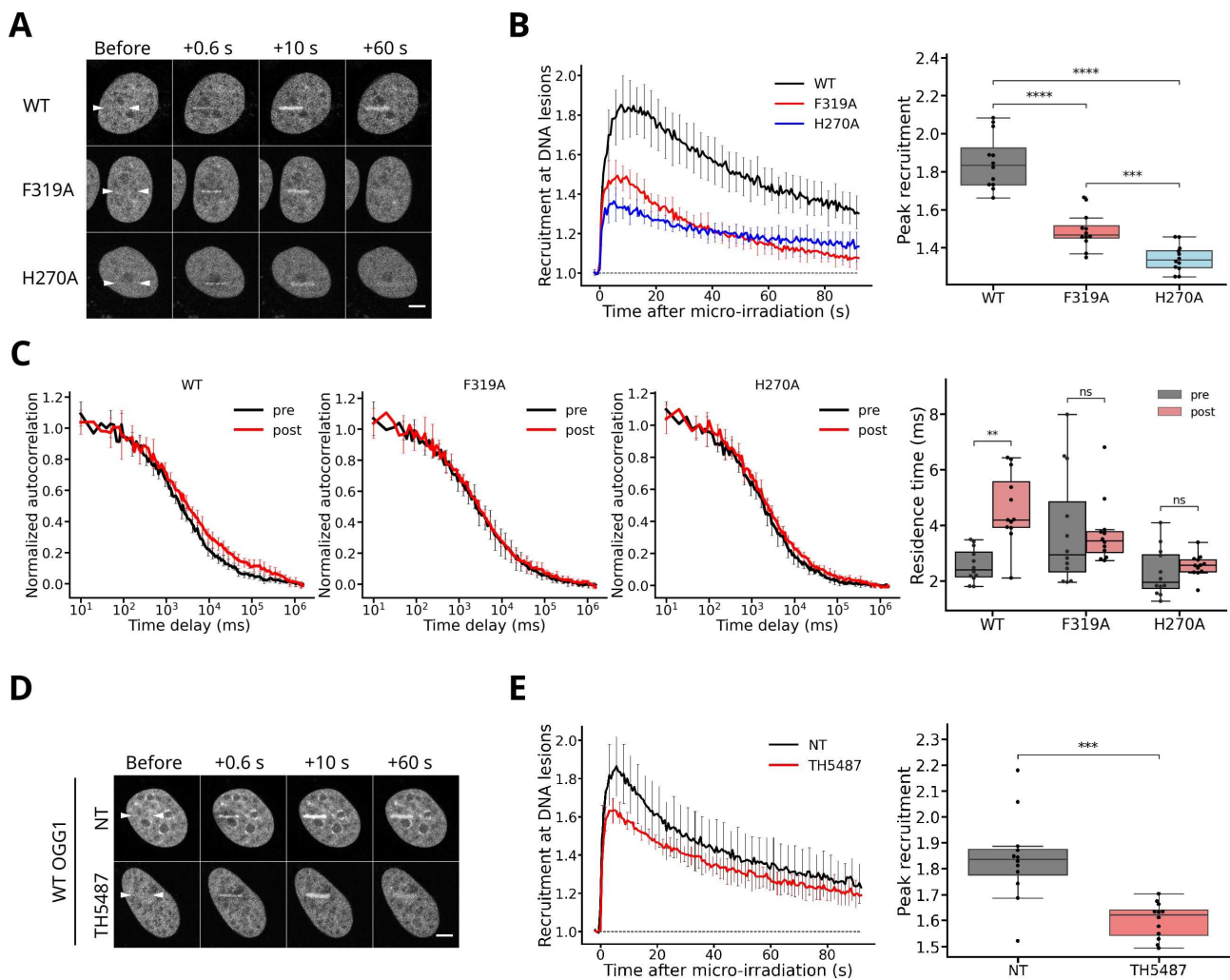
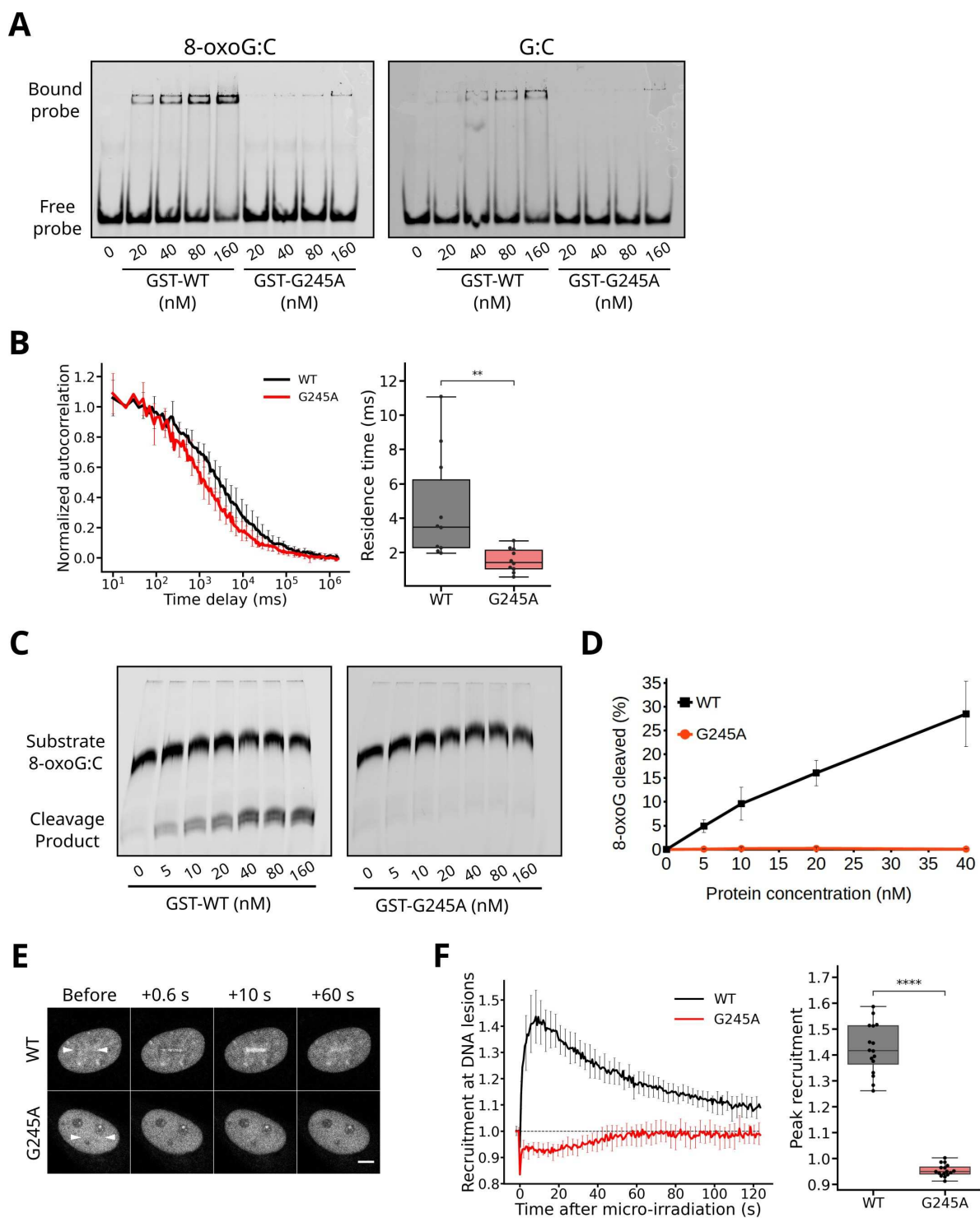


Figure P3. Direct detection of 8-oxoG by OGG1 is essential for its efficient accumulation at sites of DNA damage. (A) Representative time-course images of the accumulation of GFP-tagged OGG1-WT, OGG1-F319A and OGG1-H270A at sites of laser micro-irradiation in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells. White arrowheads indicate the micro-irradiated line. Scale bar: 5 μ m. (B) Left: Curves of the recruitment kinetics of OGG1-WT, F319A and H270A at sites of micro-irradiation derived from the images shown in A. Right: Peak recruitment extracted from the recruitment curves. 12 cells per condition. (C) Left: Normalized FCS autocorrelation curves measured for GFP-tagged OGG1-WT, OGG1-F319A and OGG1-H270A before damage (pre) and at sites of laser micro-irradiation (post) in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells. Right: Residence time of the different constructs within the focal volume estimated from the fit of the autocorrelation curves. 12 cells per condition. (D) Representative time-course images of the accumulation of WT OGG1-GFP at sites of laser micro-irradiation in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells left untreated (NT), or treated with 30 μ M of the OGG1 inhibitor TH5487. White arrowheads indicate the micro-irradiated line. Scale bar: 5 μ m. (E) Left: Curves of the recruitment kinetics of OGG1-WT at sites of micro-irradiation derived from the images shown in D. Right: Peak recruitment extracted from the recruitment curves. 12 cells per condition.

The conserved residue G245 is essential for OGG1 association with DNA

In the previous sections, we described the use of different fluorescence-based methods to assess two specific aspects of OGG1 behavior in living cells: i) how the glycosylase explores the nuclear space when searching for its cognate lesion and ii) how it efficiently accumulates at DNA lesions induced by laser micro-irradiation. Next, we used these assays to analyze the potential involvement of specific residues of OGG1 on these two components of its nuclear dynamics. We first focused on the residue G245, which belongs to the helix/hairpin/helix domain and is thought to mediate association of OGG1 with DNA (17, 19). While structural data have shown that this amino-acid contacts the DNA backbone approximately 3 bp away from the lesion (17), the exact function of this highly conserved residue remains poorly defined. By EMSA, the purified OGG1-G245A mutant displayed no detectable affinity for DNA duplexes harboring or not an 8-oxoG (Fig 4A). In cells, GFP tagged OGG1-G245A showed higher mobility than the WT protein in the absence of induced damage (Fig 4B). Together, these findings highlight the critical role of the G245 residue in OGG1 interaction with DNA irrespectively of the presence of 8-oxoG, and confirm that transient association with DNA is a key factor regulating the exploration of the nucleus by OGG1. Furthermore, in line with the impaired affinity for 8-oxoG observed *in vitro*, we also found that OGG1-G245A displayed no detectable catalytic activity (Fig 4C,D) and was unable to accumulate at DNA lesions induced by laser irradiation (Fig 4E,F).



◀ **Figure P4. Conserved residue G245 is essential for OGG1 association with DNA.** (A) Representative gel-shifts showing the binding of purified GST-tagged OGG1-WT and OGG1-G245A to 8-oxoG:C (left) and G:C (right) containing DNA duplexes for concentrations of proteins ranging between 0 and 160 nM. (B) Left: Normalized FCS autocorrelation curves measured for GFP-tagged OGG1-WT and OGG1-G245A in the absence of laser micro-irradiation in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells. Right: Residence time of the two constructs within the focal volume estimated from the fit of the autocorrelation curves. 10 cells per condition. (C) Representative gels of the cleavage of an 8-oxoG:C containing oligonucleotide by increasing concentrations of GST-tagged OGG1-WT and OGG1-G245A ranging between 0 and 160 nM. (D) Quantification of the relative amounts of cleavage product from the gels shown in C. Mean of 3 independent repeats. (E) Representative time-course images of the accumulation of GFP-tagged OGG1-WT and OGG1-G245A at sites of laser micro-irradiation in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells. White arrowheads indicate the micro-irradiated line. Scale bar: 5 μ m. (F) Left: Curves of the recruitment kinetics of OGG1-WT and OGG1-G245A at sites of micro-irradiation derived from the images shown in E. Right: Peak recruitment extracted from the recruitment curves. 16 cells per condition.

OGG1 residues involved in base probing differentially impact transient binding to undamaged DNA and accumulation at oxidized bases

The initial steps of the inspection of the oxidation status of the guanine by OGG1 are only partially understood. While previous reports suggest that at least a partial extrahelical extrusion of the probed base promoted by DNA kinking is needed (17), recent work proposed that the discrimination between non-oxidized Gs and 8-oxoGs could occur intrahelically (19). Here, we focused on the roles of the OGG1 residues Y203, N149 and N150 in these early steps of the lesion recognition. Structurally, these residues seem to act as a two-arm clamp, one arm made of residue Y203 and the second one by amino-acids N149 and N150. This clamp is initially closed with its tip, composed of residues Y203 and N149, inserted in the DNA to promote G:C or 8-oxoG:C pair melting required for base extrusion. Although it remains unclear whether this extrusion depends on the oxidation status of the G, the base flip out is associated with the opening of the clamp which holds in place the kinked double-helix and, in particular, the estranged C (19). To better understand the role of this clamp, we analyzed the consequences of mutating each of its two arms.

First, we assessed the behavior of the OGG1 mutants Y203A and N149A/N150A (herein referred to as 2NA) *in vitro*. Compared to WT, the Y203A mutant had similar affinity to lesion-free DNA duplexes while the 2NA mutant showed dramatically increased binding (Figs 5A,B, S4 and Table 1). In contrast, both mutants displayed reduced affinity for 8-oxoG containing DNA duplexes, in particular the Y203A mutant (Fig 5A,B, S4 and Table 1). Of note, the non-specific complex between OGG1 and DNA irrespectively of the presence of the lesion (C2 complex) seemed to be

characterized by a different stoichiometry compared to the specific association between the glycosylase and 8-oxoG-containing DNA duplexes (C1 complex). This might indicate that several OGG1 molecules can bind simultaneously to the same unmodified oligonucleotide at the high concentrations of glycosylase required to form the C2 complex. Interestingly, the Y203A mutant preferentially formed the non-specific complex C2 with DNA even in the presence of 8-oxoG, showing that the Y203 residue is essential for lesion recognition. We also found that both the Y203A and 2NA mutants showed dramatically reduced cleavage activity, in line with their impaired binding to 8-oxoG (Fig 5C).

Table P1. Apparent dissociation constants of purified OGG1-WT, OGG1-N149/N150A (2NA) and OGG1-Y203A bound to DNA duplexes free of damage (G:C) or containing an 8-oxoG:C base pair (8-oxoG:C). The apparent dissociation constants were estimated as the protein concentration for half maximal binding from the titration curves shown on figure 5B. Because no proper titration curve of the C1 complex could be obtained for OGG1-Y203A, we were only able to estimate a lower bound of the KDapp for this mutant based on the visual inspection of the gel-shifts on figure S3.

OGG1	Apparent dissociation constants (nM)		
	G:C*	8-oxoG:C#	Ratio G:C/8-oxoG:C
WT	2220 ± 220	0.42 ± 0.03	5286
2NA	602 ± 42	6.37 ± 0.58	95
Y203A	1970 ± 270	> 340	< 6

*KDapp for C2 complex (unspecific complex between OGG1 and the DNA duplexes)

#KDapp for C1 complex (specific recognition complex between OGG1 and 8-oxoG)

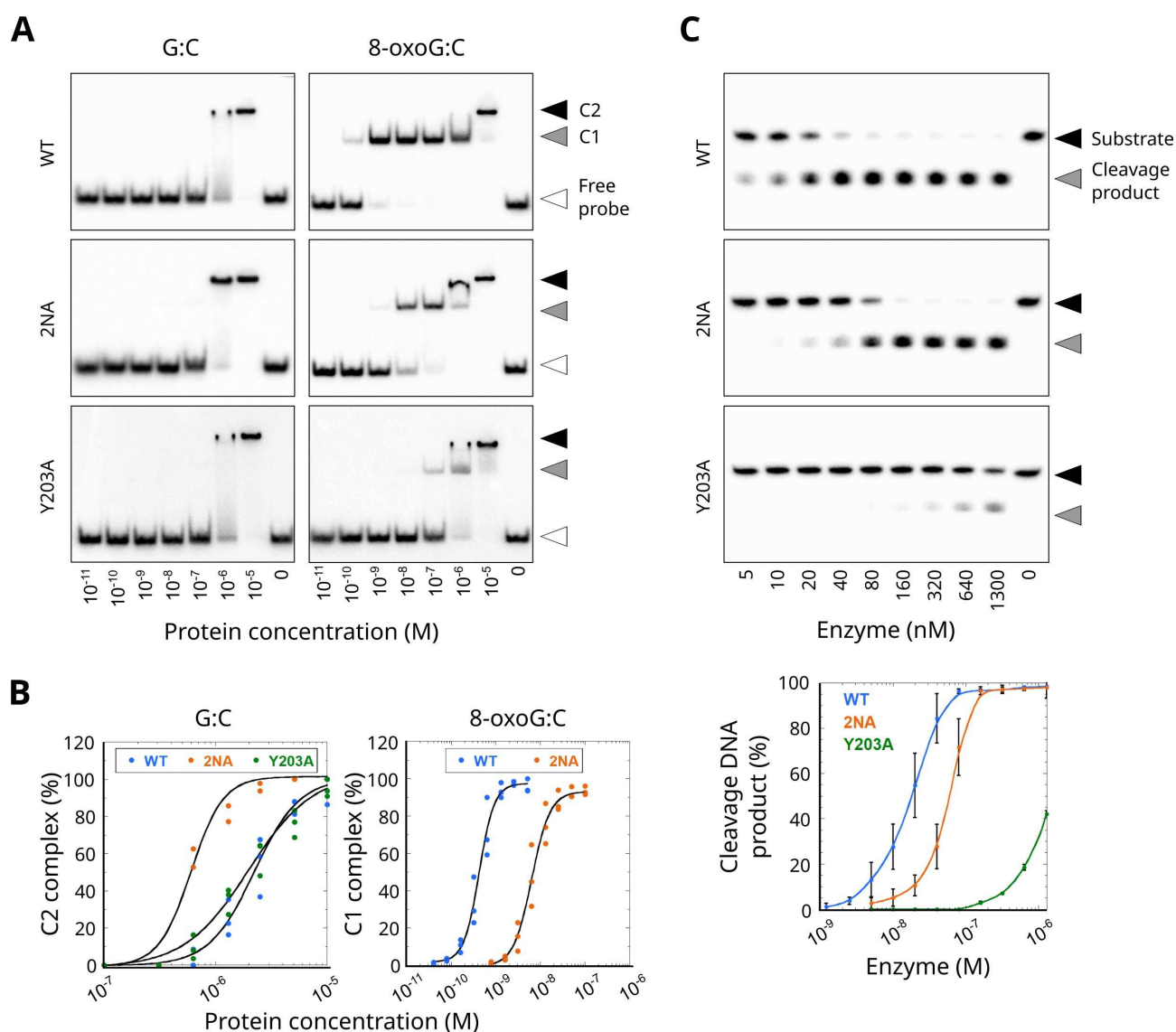


Figure P5. Mutating the probing residues Y203 and N149/N150 have differential impacts on the DNA binding properties and DNA-glycosylase activity of OGG1 *in vitro*. (A) Representative gel-shifts showing the binding of purified OGG1-WT, OGG1-N149A/N150A (2NA) and OGG1-Y203A to radiolabeled DNA duplexes free of damage (G:C) or containing an 8-oxoG:C pair (8-oxoG:C). The protein concentrations are shown below the gels. C1 refers to the specific lesion recognition complex composed of 1 protein per 8-oxoG:C probe while C2 corresponds to a non-specific complex probably composed of two OGG1 proteins binding to one DNA duplex molecule, irrespectively of the presence of the lesions. (B) Titration curves of the relative amounts of DNA/protein complex (C1 or C2 as indicated) as a function of the protein concentration for OGG1-WT, OGG1-2NA and OGG1-Y203A interacting with an undamaged DNA probe (G:C) or an 8-oxoG:C containing DNA probe (8-oxoG:C). These titration curves were estimated from the gel-shifts shown on Fig S4. Each point corresponds to the mean of at least three independent repeats. For OGG1-Y203A, the dramatic loss of affinity for 8-oxoG did not allow to monitor the titration curve of the C1 complex. (C) Top: Representative gels of the amounts of 8-oxoG:C containing radiolabelled oligonucleotide substrate (S) and its OGG1 cleavage product (P) for growing concentrations of OGG1-WT, OGG1-2NA and OGG1-Y203A. Bottom: Quantification of the relative amounts of cleavage product as a function of the protein concentration from the gels shown above. Each point corresponds to the mean of at least three independent repeats.

Next, we analyzed the impact of the Y203A and 2NA mutations on the behavior of OGG1 in living cells. In the absence of induced damage, the nuclear mobility of the Y203A mutant was similar to that of the WT (Fig 6A), while the 2NA mutant was drastically slower (Fig 6B), indicating a stronger interaction with undamaged DNA for the latter. These results are fully consistent with the relative affinities of these two mutants for lesion-free DNA duplexes (Fig 5A,B, S4). Importantly, FRAP recovery time measured for the 2NA mutant still increased with the size of the bleached area (Fig S5A,B) suggesting that mutating residues N149/N150 did not lead to a switch of the OGG1 nuclear exploration regime. Therefore, similar to wild-type, the 2NA mutant keeps rapidly alternating between a DNA-bound and a diffusive state but mutating these two residues tends to displace the equilibrium towards the bound state. Upon laser micro-irradiation, we observed only minor accumulation of OGG1-Y203A compared to WT (Fig 6C,D), in line with its loss of ability to recognize 8-oxoG *in vitro* (Fig 5A,B, S4). The 2NA mutant was still able to accumulate in micro-irradiated regions although at lower level than WT OGG1 (Fig 6C,D), which is also consistent with the reduced binding of this mutant to the 8-oxoG containing DNA duplexes (Fig 5A,B, S4). Interestingly, OGG1-2NA displayed persistent accumulation in the damaged area, a feature that was also observed for OGG1-K249Q (Fig 6C-E), a well characterized mutant of OGG1 which binds to 8-oxoG but is unable to excise it (25, 40, 46). Despite this persistent accumulation, both mutants still displayed rapid turnover at sites of damage, similar to what was observed for WT OGG1 (Fig S5C). We also found that the release of WT OGG1 was impaired in cells treated with O8-Cl, a small molecule inhibitor that blocks OGG1 catalytic activity without affecting its binding to 8-oxoG (Fig 6F,G) (47, 48). Given that the glycosylase activity of OGG1-2NA was severely impaired (Fig 5C), these different results consistently show that the release of OGG1 from the damaged area is correlated with the progressive clearance of the 8-oxoG. This agrees with what has been shown after cell treatment with oxidizing agents (46).

Taken together these results complement the current structural data by showing that the mutation of residues Y203 and N149/N150, both involved at early stages of the initiation and stabilization of base extrusion, has drastically different impacts on the dynamic behavior of the glycosylase inside the nucleus.

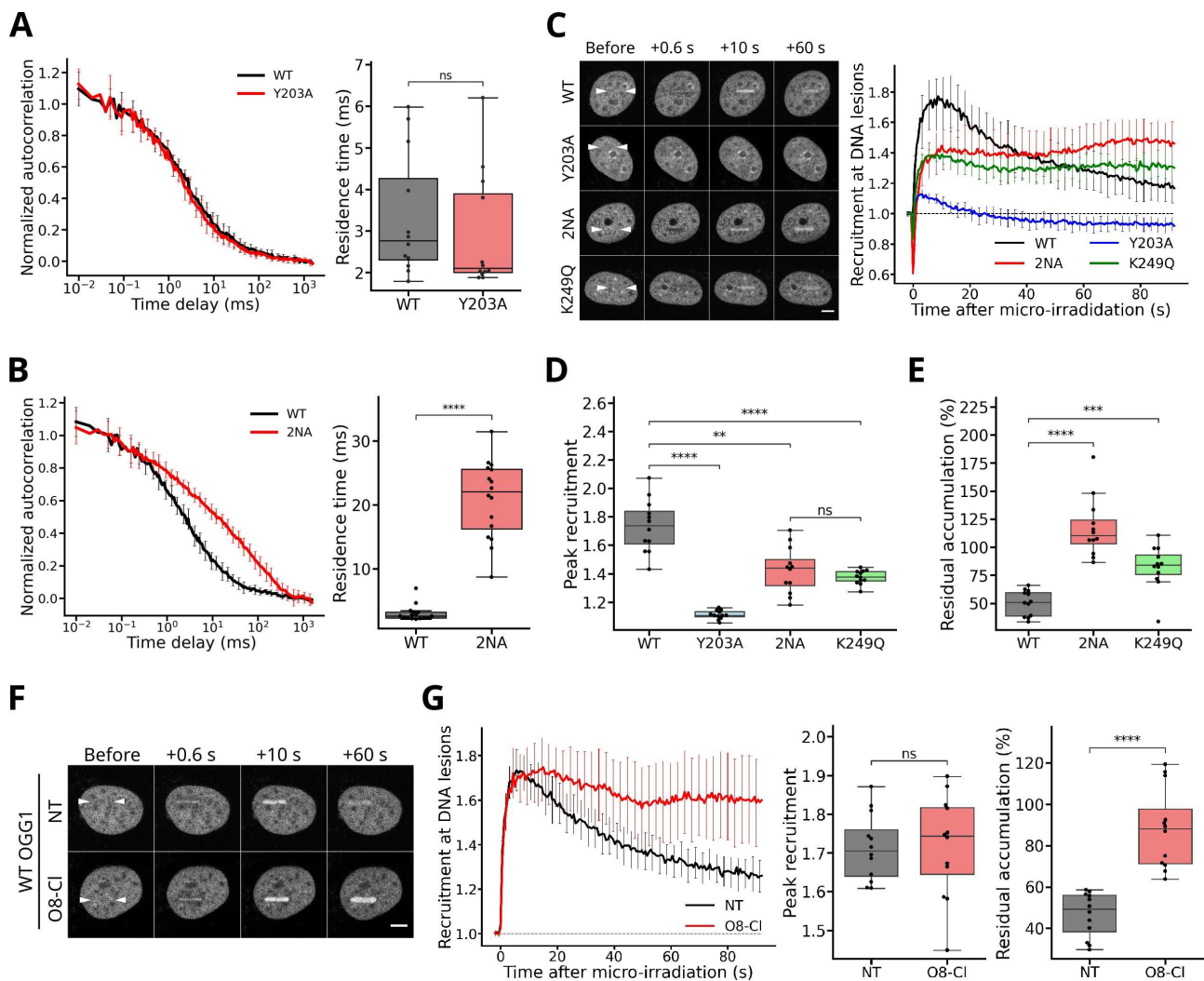


Figure P6. Mutating the probing residues Y203 and N149/N150 have differential impacts the dynamics of OGG1 DNA scanning and recruitment to laser-induced 8-oxoG in living cells. (A) Left: Normalized FCS autocorrelation curves for GFP-tagged OGG1-WT and OGG1-Y203A in the absence of laser micro-irradiation in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells. Right: Residence time of the two constructs within the focal volume estimated from the fit of the autocorrelation curves. 12 cells per condition. (B) Left: Normalized FCS autocorrelation curves for GFP-tagged OGG1-WT and OGG1-N149A/N150A (2NA) in the absence of laser micro-irradiation in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells. Right: Residence time of the two constructs within the focal volume estimated from the fit of the autocorrelation curves. 16 cells per condition. (C) Left: Representative time-course images of the accumulation of GFP-tagged OGG1-WT, OGG1-Y203A, OGG1-2NA and OGG1-K249Q at sites of laser micro-irradiation in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells. White arrowheads indicate the micro-irradiated line. Scale bar: 5 μ m. Right: Curves of the recruitment kinetics of the different OGG1 constructs at sites of micro-irradiation derived from the images shown on the left. (D) Peak recruitment of the different OGG1 constructs extracted from the recruitment curves shown in C. 12 cells per condition. (E) Residual accumulation relative to peak recruitment estimated for OGG1-WT, OGG1-2NA and OGG1-K249Q from the recruitment curves shown in C. This relative residual accumulation is measured at the time corresponding to the dissipation of half of the peak recruitment for the wild-type construct. 12 cells per condition. (F) Representative time-course images of the accumulation of WT OGG1-GFP at sites of laser micro-irradiation in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells left untreated (NT), or treated with 30 μ M of the OGG1 inhibitor O8-Cl. White arrowheads indicate the micro-irradiated line. Scale bar: 5 μ m. ►

- ◀ (G) Left: Curves of the recruitment kinetics of OGG1-WT at sites of micro-irradiation derived from the images shown in F. Right: Peak recruitment and residual accumulation extracted from the recruitment curves. 12 cells per condition.

DISCUSSION

OGG1, similarly to all other nuclear proteins looking for rare targets along the genome, faces a paradoxical challenge: it must be both rapid and selective in detecting its cognate lesion. This is particularly difficult for OGG1 since 8-oxoG is deeply buried within the double-helix, therefore requiring careful probing of each base (17). Our results by FCS and FRAP demonstrate that OGG1 is not freely diffusive within the nucleus but dynamically associates with the DNA (Fig 1). We found that the characteristic duration of each state, DNA-bound or freely diffusive, are similar, demonstrating that OGG1 explores the nuclear environment by rapidly alternating between short-lived association with DNA and periods of 3D free diffusion, in agreement with previous *in vitro* data (21, 37). Importantly, our findings also showed that the transient binding to DNA during nuclear exploration was not controlled by Y203, H270 or F319 (Figs 3C, 6A, 7), which are important for 8-oxoG detection at different steps of the OGG1/DNA association (40, 49), but rather rely on the conserved but poorly characterized G245 residue. This dynamic association with DNA mediated by G245 is also essential for OGG1 recruitment to DNA lesions and therefore, for 8-oxoG cleavage (Fig 4). Because this residue is located away from the extruded base (17), it seems unlikely that it directly contributes to the base flip-out or 8-oxoG recognition. Instead, it probably allows an initial contact to be established between OGG1 and the double-helix, therefore initiating the search along the DNA (Fig 7). The spatial resolution of our live cell assays was not sufficient to assess 1D diffusion of OGG1 along the DNA but it would be important in the future to establish whether this “landing residue” G245 could also regulate translocation reported for OGG1 along DNA oligonucleotides in single molecule analysis (21).

In agreement with previous results (17, 49, 50), we found that the residue Y203 plays a central role in the recognition of 8-oxoG, and therefore, is essential for efficient OGG1 recruitment to sites of damage (Figs 5A,B, 6A,C-D, S4). Nevertheless, structural data indicate that Y203 does not directly participate to the detection of the lesion, but rather promotes base pair destabilization (17, 51), which is probably a prerequisite for this detection (Fig 7). Then, the fact that the Y203A mutant transiently associates with undamaged DNA similarly to WT OGG1 suggests that the fraction of time spent by OGG1 for base discrimination during its transits on the DNA is small. This would be compatible

with an intrahelical detection of the lesion avoiding the need for a potentially lengthy base flip-out process, as proposed recently (19). Alternatively, if extrusion is needed for base discrimination, this step should be fast compared to other processes such as OGG1 accommodation onto the DNA to promote local bending of the double helix.

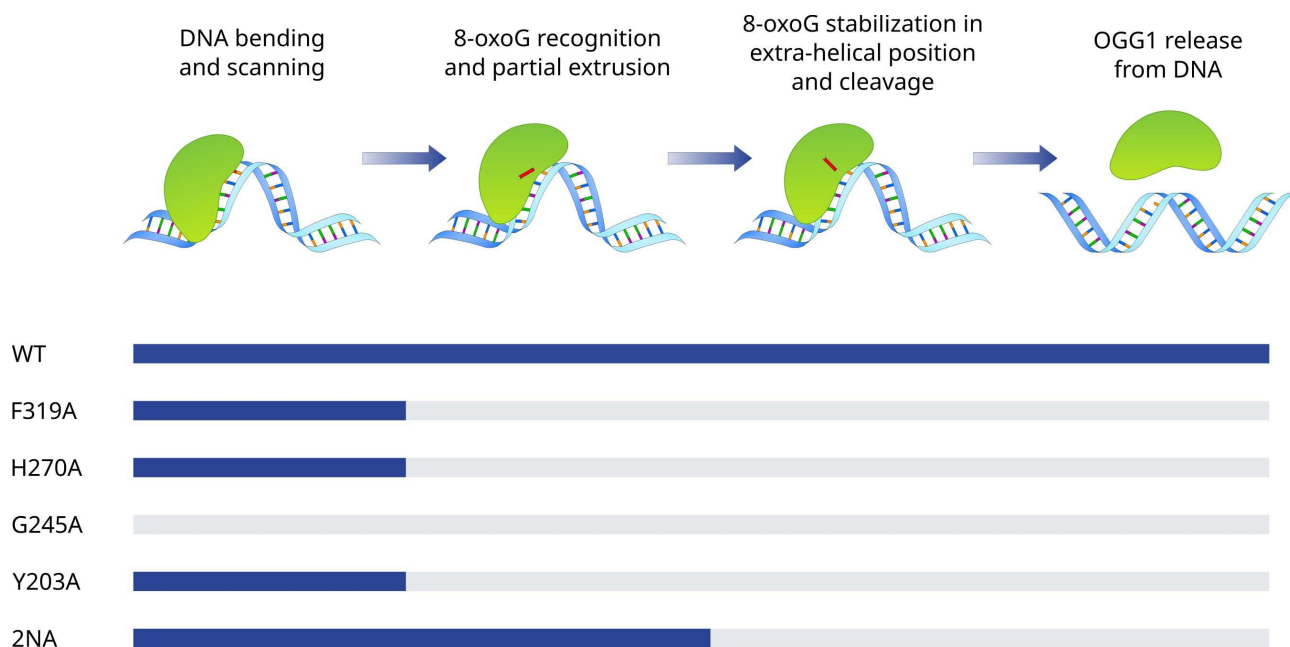


Figure P7. Model summarizing the impacts of the mutations studied in this work on the different steps of 8-oxoG detection and clearance by OGG1.

The N149 and N150 residues could also contribute to base pair destabilization and flip-out by invading the void created by the extruded base and holding the distorted DNA backbone in place (17). However, provided that this base destabilization/extrusion is needed for lesion detection, our results show that residues N149 and N150 are dispensable for this process since OGG1-2NA could still recognize 8-oxoG *in vitro* and recruit to sites of damage in living cells (Figs 5A,B, 6C,D). Rather than facilitating base destabilization/extrusion, the dramatic increase in binding to undamaged DNA observed for the OGG1-2NA mutant (Figs 5A, 6B) suggests that residues N149 and N150 may help to stabilize the local structure of the DNA to avoid an over-distortion of the double-helix that could lead to a trapping of OGG1 on the DNA. As such, residues N149 and N150 would be essential to ensure the rapid reversibility of the destabilization/flip-out process in case of a normal guanine, thus allowing for a fast scanning of the DNA.

Besides these early aspects of base inspection, our results also demonstrate that OGG1 relies on its ability to directly recognize 8-oxoG to quickly accumulate at sites of DNA damage (Figs 3, S3).

Furthermore, we observed a rapid turnover of the glycosylase at sites of DNA lesions, with exchange rates of few seconds based on our FRAP data (Fig 2C,D). This high turnover is also observed for OGG1 mutants that are unable to efficiently excise 8-oxoG (Fig S5C). Altogether, these data suggest that, rather than following a full sequential process starting from 8-oxoG detection, cleavage and release from the DNA, OGG1 proteins recruited to sites of damage often dissociate from the lesions before actual 8-oxoG cleavage, leading to abortive transit on the damaged DNA. Additional work will be needed to understand the mechanisms regulating this dynamic accumulation of OGG1 at DNA lesions, which probably also involve additional cofactors such as the chromatin scaffolding complex cohesin (52) or the damage sensor UV-DDB (53, 54). The approaches developed in the current work will help to further characterize the involvement of these cofactors regulating the efficiency of 8-oxoG clearance by OGG1 in the living cell context.

DATA AVAILABILITY

The raw datasets used in the current study are available upon reasonable request.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Microscopy-Rennes Imaging Center (BIOSIT, Université Rennes 1), member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04), for providing access to the imaging setups, as well as S. Dutertre and X. Pinson for technical assistance on the microscopes. We would like to thank J. Ellenberg for sharing the plasmids coding for the GFP dimer and GFP pentamer and F. Zhang for the one coding for the GFP-tagged Cas9.

FUNDING

For this work, the groups from S.H. and B.C. received joint financial support from the Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest (committees 22, 29, 35, 37 and 45) and S.H. received support from the Institut Universitaire de France. B.C. was also funded by the Région Centre-Val de Loire (2013-00082978 and 2017-00117252) and by the Cancéropôle Grand-Ouest (project CONCERTO, 2018-001240994). R.S. and J.P.R. are supported by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (PDF20181208405 and PJA20181207762, respectively). The A.C. lab received funding from the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) Radiobiology program and by the Agence Nationale de la

Recherche (PRCI-2018 TG-TOX). O.D.A is supported by a joint fellowship funded by the Région Bretagne, the CEA and the Ligue Nationale Contre le Cancer.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

O.D.A, V.G., C.S. A.M.D.G and J.P.R. completed the experiments within the manuscript. R.S., C.C. J.D., X.V., and D.B. generated cell lines and DNA constructs. J.P.R. and B.C. provided expert advice and supervised the *in vitro* experiments. A.C. and S.H. conceived and supervised this study. O.D.A, J.P.R., A.C and S.H. wrote the manuscript. All authors read and commented on the manuscript.

REFERENCES

1. Hall,D.B., Holmlin,R.E. and Barton,J.K. (1996) Oxidative DNA damage through long-range electron transfer. *Nature*, **382**, 731–735.
2. Sampath,H., McCullough,A.K. and Lloyd,R.S. (2012) Regulation of DNA glycosylases and their role in limiting disease. *Free Radical Research*, **46**, 460–478.
3. Sheng,Z., Oka,S., Tsuchimoto,D., Abolhassani,N., Nomaru,H., Sakumi,K., Yamada,H. and Nakabeppu,Y. (2012) 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during MUTYH-mediated DNA base excision repair. *J Clin Invest*, **122**, 4344–4361.
4. López-Otín,C., Blasco,M.A., Partridge,L., Serrano,M. and Kroemer,G. (2013) The Hallmarks of Aging. *Cell*, **153**, 1194–1217.
5. Bradley-Whitman,M.A., Timmons,M.D., Beckett,T.L., Murphy,M.P., Lynn,B.C. and Lovell,M.A. (2014) Nucleic acid oxidation: an early feature of Alzheimer’s disease. *Journal of Neurochemistry*, **128**, 294–304.
6. Grollman,A.P. and Moriya,M. (1993) Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends in Genetics*, **9**, 246–249.
7. Bjrås,M., Luna,L., Johnsen,B., Hoff,E., Haug,T., Rognes,T. and Seeberg,E. (1997) Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *EMBO J*, **16**, 6314–6322.
8. Radicella,J.P., Dherin,C., Desmaze,C., Fox,M.S. and Boiteux,S. (1997) Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8010–8015.
9. Roldán-Arjona,T., Wei,Y.-F., Carter,K.C., Klungland,A., Anselmino,C., Wang,R.-P., Augustus,M. and Lindahl,T. (1997) Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 8016.
10. Rosenquist,T.A., Zharkov,D.O. and Grollman,A.P. (1997) Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7429–7434.
11. Fortini,P. and Dogliotti,E. (2007) Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair*, **6**, 398–409.

12. Boiteux,S., Coste,F. and Castaing,B. (2017) Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Radical Biology and Medicine*, **107**, 179–201.
13. Gannett,P.M. and Sura,T.P. (1993) Base pairing of 8-oxoguanosine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine with 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxycytosine, 2'-deoxyguanosine, and thymidine. *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 690–700.
14. Cheng,X., Kelso,C., Hornak,V., de los Santos,C., Grollman,A.P. and Simmerling,C. (2005) Dynamic Behavior of DNA Base Pairs Containing 8-Oxoguanine. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13 906–13 918.
15. Kitsera,N., Stathis,D., Lühnsdorf,B., Müller,H., Carell,T., Epe,B. and Khobta,A. (2011) 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1. *Nucleic Acids Res*, **39**, 5926–5934.
16. Yudkina,A.V., Shilkin,E.S., Endutkin,A.V., Makarova,A.V. and Zharkov,D.O. (2019) Reading and Misreading 8-oxoguanine, a Paradigmatic Ambiguous Nucleobase. *Crystals*, **9**, 269.
17. Bruner,S.D., Norman,D.P., Fromme,J.C. and Verdine,G.L. (2000) Structural and mechanistic studies on repair of 8-oxoguanine in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **65**, 103–111.
18. Banerjee,A., Yang,W., Karplus,M. and Verdine,G.L. (2005) Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA. *Nature*, **434**, 612–618.
19. Shigdel,U.K., Ovchinnikov,V., Lee,S.-J., Shih,J.A., Karplus,M., Nam,K. and Verdine,G.L. (2020) The trajectory of intrahelical lesion recognition and extrusion by the human 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Nat Commun*, **11**, 4437.
20. Kuznetsov,N.A., Bergonzo,C., Campbell,A.J., Li,H., Mechetin,G.V., de los Santos,C., Grollman,A.P., Fedorova,O.S., Zharkov,D.O. and Simmerling,C. (2015) Active destabilization of base pairs by a DNA glycosylase wedge initiates damage recognition. *Nucleic Acids Res*, **43**, 272–281.
21. Blainey,P.C., van Oijen,A.M., Banerjee,A., Verdine,G.L. and Xie,X.S. (2006) A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5752–5757.
22. Schaich,M.A. and Van Houten,B. (2021) Searching for DNA Damage: Insights From Single Molecule Analysis. *Front Mol Biosci*, **8**, 772 877.
23. Menoni,H., Shukla,M.S., Gerson,V., Dimitrov,S. and Angelov,D. (2012) Base excision repair of 8-oxoG in dinucleosomes. *Nucleic Acids Res*, **40**, 692–700.
24. D'Augustin,O., Huet,S., Campalans,A. and Radicella,J.P. (2020) Lost in the Crowd: How Does Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1 (OGG1) Find 8-Oxoguanine in the Genome? *Int J Mol Sci*, **21**, E8360.
25. Campalans,A., Kortulewski,T., Amouroux,R., Menoni,H., Vermeulen,W. and Radicella,J.P. (2013) Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair. *Nucleic Acids Res*, **41**, 3115–3129.
26. Bancaud,A., Huet,S., Daigle,N., Mozziconacci,J., Beaudouin,J. and Ellenberg,J. (2009) Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J*, **28**, 3785–3798.
27. Campalans,A., Amouroux,R., Bravard,A., Epe,B. and Radicella,J.P. (2007) UVA irradiation induces relocalisation of the DNA repair protein hOGG1 to nuclear speckles. *J. Cell. Sci.*, **120**, 23–32.
28. Hansson,M.D., Rzeznicka,K., Rosenbäck,M., Hansson,M. and Sirijovski,N. (2008) PCR-mediated deletion of plasmid DNA. *Anal Biochem*, **375**, 373–375.
29. Diebold,M.-L., Fribourg,S., Koch,M., Metzger,T. and Romier,C. (2011) Deciphering correct strategies for multiprotein complex assembly by co-expression: application to complexes as large as the histone octamer. *J Struct Biol*, **175**, 178–188.

30. Li,M.Z. and Elledge,S.J. (2007) Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods*, **4**, 251–256.
31. Ran,F.A., Hsu,P.D., Wright,J., Agarwala,V., Scott,D.A. and Zhang,F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, **8**, 2281–2308.
32. Le Meur,R., Culard,F., Nadan,V., Goffinont,S., Coste,F., Guerin,M., Loth,K., Landon,C. and Castaing,B. (2015) The nucleoid-associated protein HU enhances 8-oxoguanine base excision by the formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Biochem J*, **471**, 13–23.
33. Guibourt,N., Castaing,B., Van Der Kemp,P.A. and Boiteux,S. (2000) Catalytic and DNA binding properties of the ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison between the wild type and the K241R and K241Q active-site mutant proteins. *Biochemistry*, **39**, 1716–1724.
34. Castaing,B., Boiteux,S. and Zelwer,C. (1992) DNA containing a chemically reduced apurinic site is a high affinity ligand for the *E. coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res*, **20**, 389–394.
35. 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.
36. Wachsmuth,M., Conrad,C., Bulkescher,J., Koch,B., Mahen,R., Isokane,M., Pepperkok,R. and Ellenberg,J. (2015) High-throughput fluorescence correlation spectroscopy enables analysis of proteome dynamics in living cells. *Nat Biotech*, **33**, 384–389.
37. Vestergaard,C.L., Blainey,P.C. and Flyvbjerg,H. (2018) Single-particle trajectories reveal two-state diffusion-kinetics of hOGG1 proteins on DNA. *Nucleic Acids Res*, **46**, 2446–2458.
38. Sutherland,W. (1905) LXXV. A dynamical theory of diffusion for non-electrolytes and the molecular mass of albumin. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, **9**, 781–785.
39. Einstein,A. (1905) Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Einstein, Albert: Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*.
40. van der Kemp,P.A., Charbonnier,J.-B., Audebert,M. and Boiteux,S. (2004) Catalytic and DNA-binding properties of the human Ogg1 DNA N-glycosylase/AP lyase: biochemical exploration of H270, Q315 and F319, three amino acids of the 8-oxoguanine-binding pocket. *Nucleic Acids Res*, **32**, 570–578.
41. Michelman-Ribeiro,A., Mazza,D., Rosales,T., Stasevich,T.J., Boukari,H., Rishi,V., Vinson,C., Knutson,J.R. and McNally,J.G. (2009) Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*, **97**, 337–346.
42. Sprague,B.L. and McNally,J.G. (2005) FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol*, **15**, 84–91.
43. Beaudouin,J., Mora-Bermúdez,F., Klee,T., Daigle,N. and Ellenberg,J. (2006) Dissecting the contribution of diffusion and interactions to the mobility of nuclear proteins. *Biophys J*, **90**, 1878–1894.
44. Visnes,T., Cázares-Körner,A., Hao,W., Wallner,O., Masuyer,G., Loseva,O., Mortusewicz,O., Wiita,E., Sarno,A., Manoilov,A., *et al.* (2018) Small-molecule inhibitor of OGG1 suppresses proinflammatory gene expression and inflammation. *Science*, **362**, 834–839.
45. Hanna,B.M.F., Helleday,T. and Mortusewicz,O. (2020) OGG1 Inhibitor TH5487 Alters OGG1 Chromatin Dynamics and Prevents Incisions. *Biomolecules*, **10**, E1483.
46. Amouroux,R., Campalans,A., Epe,B. and Radicella,J.P. (2010) Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions., Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res*, **38**, 2878, 2878–2890.
47. Donley,N., Jaruga,P., Coskun,E., Dizdaroglu,M., McCullough,A.K. and Lloyd,R.S. (2015) Small Molecule Inhibitors of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 (OGG1). *ACS Chem. Biol.*, **10**, 2334–2343.

48. Hao,W., Wang,J., Zhang,Y., Wang,C., Xia,L., Zhang,W., Zafar,M., Kang,J.-Y., Wang,R., Ali Bohio,A., *et al.* (2020) Enzymatically inactive OGG1 binds to DNA and steers base excision repair toward gene transcription. *FASEB J*, **34**, 7427–7441.
49. Lukina,M.V., Koval,V.V., Lomzov,A.A., Zharkov,D.O. and Fedorova,O.S. (2017) Global DNA dynamics of 8-oxoguanine repair by human OGG1 revealed by stopped-flow kinetics and molecular dynamics simulation. *Mol Biosyst*, **13**, 1954–1966.
50. Kuznetsova,A.A., Kuznetsov,N.A., Ishchenko,A.A., Saparbaev,M.K. and Fedorova,O.S. (2014) Step-by-step mechanism of DNA damage recognition by human 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Biochim Biophys Acta*, **1840**, 387–395.
51. Qi,Y., Spong,M.C., Nam,K., Banerjee,A., Jiralerspong,S., Karplus,M. and Verdine,G.L. (2009) Encounter and extrusion of an intrahelical lesion by a DNA repair enzyme. *Nature*, **462**, 762–766.
52. Lebraud,E., Pinna,G., Siberchicot,C., Depagne,J., Busso,D., Fantini,D., Irbah,L., Robeska,E., Kratassiouk,G., Ravanat,J.-L., *et al.* (2020) Chromatin recruitment of OGG1 requires cohesin and mediator and is essential for efficient 8-oxoG removal. *Nucleic Acids Res*, **48**, 9082–9097.
53. Jang,S., Kumar,N., Beckwitt,E.C., Kong,M., Fouquerel,E., Rapić-Otrin,V., Prasad,R., Watkins,S.C., Khuu,C., Majumdar,C., *et al.* (2019) Damage sensor role of UV-DDB during base excision repair. *Nat Struct Mol Biol*, **26**, 695–703.
54. Kumar,N., Theil,A.F., Roginskaya,V., Ali,Y., Calderon,M., Watkins,S.C., Barnes,R.P., Opresko,P.L., Pines,A., Lans,H., *et al.* (2022) Global and transcription-coupled repair of 8-oxoG is initiated by nucleotide excision repair proteins. *Nat Commun*, **13**, 974.

SUPPLEMENTARY TABLES

Table SP1. List of plasmids used in this study

Plasmid	Source
OGG1-L1-GFP	This study
OGG1(F319A)-L1-GFP	This study
OGG1(H270A)-L1-GFP	This study
OGG1(H270L)-L1-GFP	This study
OGG1(G245A)-L1-GFP	This study
OGG1(2NA)-L1-GFP	This study
OGG1(Y203A)-L1-GFP	This study
OGG1(K249Q)-L1-GFP	This study
APE1-GFP	Campalans <i>et al.</i> , 2013
GFP2	Gift from Jan Ellenberg (Euroscarf P30 623), Bancaud <i>et al.</i> , 2009
GFP5	Gift from Jan Ellenberg (Euroscarf P30 624), Bancaud <i>et al.</i> , 2009
GST-OGG1	This study
GST-OGG1(G245A)	This study
His-OGG1	Le Meur <i>et al.</i> , 2015
His-OGG1(Y203A)	This study

His-OGG1(2NA)	This study
---------------	------------

Table SP2. List of oligonucleotides used in this study. Oligonucleotides are used as indicated in Material and Methods.

Oligonucleotide	Sequence (5' -> 3')
OGG1-GFP Linker addition (For)	TCCGGAGCGGCCGCTGCAGGAGGCAGC- CAAAAATGGTGAGCAAGGGCG
OGG1-GFP Linker addition (Rev)	GCCGCTCCGGATGGATCCGGGCCTTC
Mutation K249Q (For). In OGG1-GFP	CAGGTGGCTGACTGCATCTG
Mutation K249Q (Rev). In OGG1-GFP	GCAGTCAGCCACCTGGGTACCCACTCCAGGCAGGATG
Mutation F319A (For). In OGG1-GFP	GCCAGTGCCGACCTGCG
Mutation F319A (Rev). In OGG1-GFP	GGTCGGCACTGGCCAGCACCGCTTGGGC
Mutation G245A (For). In OGG1-GFP	CAGTGGGCACCAAGGTGG
Mutation G245A (Rev). In OGG1-GFP	CCTTGGTGCCCACTGCAGGCAGGATGCAGAGGG
Mutation H270A (For). In OGG1-GFP	GCGATGTGGCACATTGCCCAAC
Mutation H270A (Rev). In OGG1-GFP	CAATGTGCCACATCGCGACATCCACGGGCACAG
Mutation H270L (For). In OGG1-GFP	TTATGTGGCACATTGCCCAAC
Mutation H270L (Rev). In OGG1-GFP	GGCAATGTGCCACATAAGGACATCCACGGGCAC
Mutation N149A/N150A (2NA) (For). In OGG1-GFP and HisTag-OGG1	GCGGCCAACATCGCCCGCATCAC
Mutation N149A/N150A (2NA) (Rev). In OGG1-GFP and HisTag-OGG1	CGATGTTGGCCGCGGAGGAACAGATAAAAAGA- GAAAAGGC
Mutation Y203A (For). In OGG1-GFP	GTAACGGGCACGAGCGCCCAGGCCACGC
Mutation Y203A (Rev). In OGG1-GFP	CTGGGCCTGGGCGCTCGTGCCCCGTTAC
Mutation Y203A (For). In HisTag-OGG1	GCCCCGTGCCCGTTACGTG
Mutation Y203A (Rev). In HisTag-OGG1	CGGGCACGGGCGCCCAGGCCACGC
Generation of GST-OGG1 plasmids (For)	GAAAACCTTTACTTCCAGGGCCACGT- GATGCCTGCCCGCG
Generation of GST-OGG1 plasmids (Rev)	GGGCTAGCTCTAGACTATTAGGATCCT- CAGCCTTCCGGCCCTTTG
Cy5-8-oxoG.DNA glycosylase activity (Fig 4)	(Cy5)-GGCTTCATCGTTGTC(8oxoG)CAGACCTGGTGGA- TACCG
Cy5-Undamaged. DNA glycosylase activity (Fig 4)	(Cy5)-GGCTTCATCGTTGTCGCAGACCTGGTGATACCG
Complementary G(C)G for Cy5. DNA glycosylase activity (Fig 4)	CGGTATCCACCAGGTCTGCGACAACGATGAAGCC
5'-[32P]-labeled-oxoG. DNA glycosylase activity (Fig 5)	CTGATCGATGAC(8oxoG)CCTGACATGAT
5'-[32P]-labeled-undamaged. DNA glycosylase activity (Fig 5)	CTGATCGATGACGCCTGACATGAT
Complementary G(C)G for 5'-[32P]-labeled. DNA glycosylase activity (Fig 5)	ATCATGTCAGGCGTCATCGATCAG
guideRNA OGG1 Exon3 (antisense)	CACCGAAAGAGAAAAGGCATTTCGAT
guideRNA OGG1 Exon3 (sense)	AAACATCGAATGCCTTTTCTCTTTC

SUPPLEMENTARY FIGURES

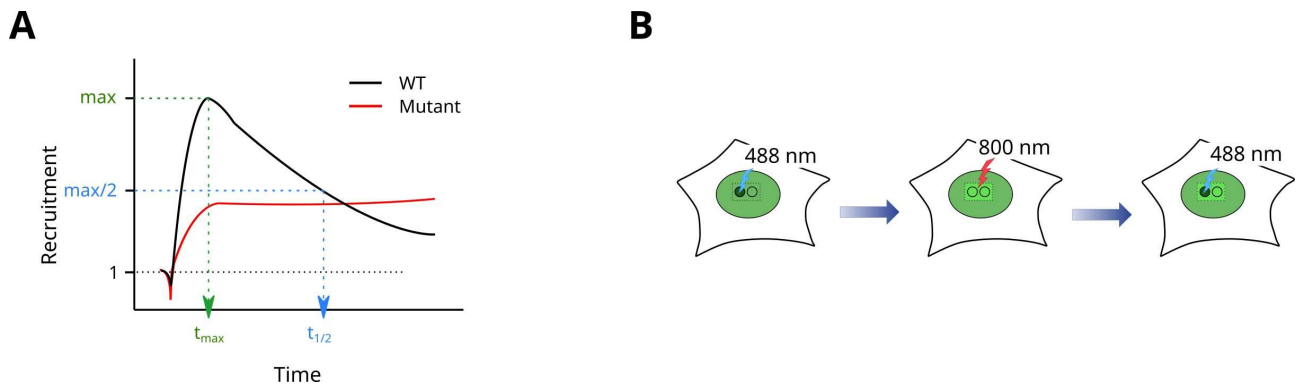


Figure SP1. Analysis of protein recruitment kinetics and fluorescence recovery after photobleaching at sites of laser micro-irradiation. (A) To assess protein retention of OGG1 mutants at DNA lesions compared to WT, the times of the peak recruitment (t_{max}) and dissipation of half of the peak signal ($t_{1/2}$) were first estimated from the recruitment curves of OGG1 WT. Then, the recruitment intensity at time $t_{1/2}$ is computed as the percentage of the fluorescence intensity at t_{max} for the different OGG1 constructs. **(B)** To estimate the fluorescence recovery at DNA lesions, the fluorescence intensities were measured in two neighboring regions within the micro-irradiated area: the photobleached region and an unbleached reference region. After background subtraction, the ratio between the intensities in the bleached and unbleached regions was estimated.

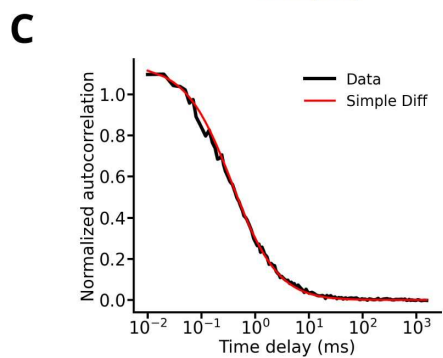
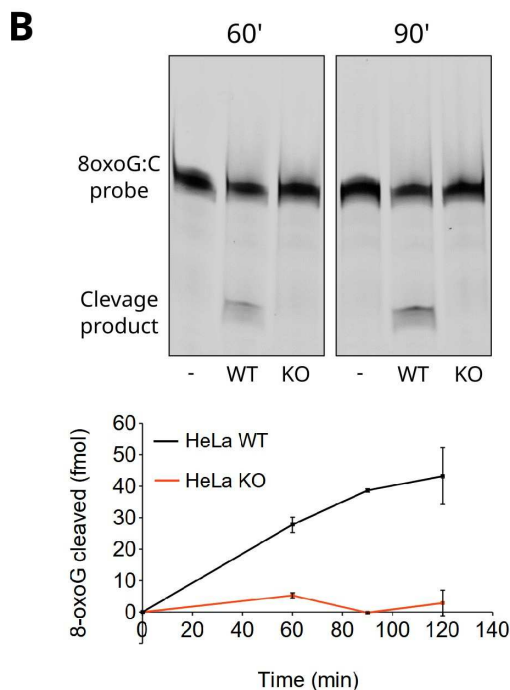
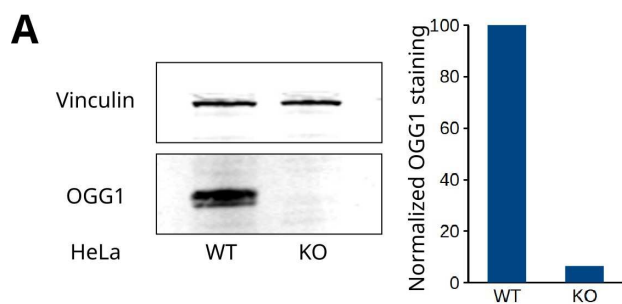


Figure SP2. Validation of the HeLa OGG1 KO cell line and analysis of the nuclear dynamics of the GFP dimer. (A) Left: Western blot of HeLa WT and OGG1 knockout cells. Vinculin is used as a loading control. Right: Quantification of the relative amount of OGG1 staining from the gel shown on the left. (B) Top: Representative gels of the amounts of 8-oxoG:C containing oligonucleotide substrate and its OGG1 cleavage product in the absence of cell extract (-) or incubated for the indicated times with extracts of WT or OGG1 KO HeLa cells. Bottom: Quantification of the relative amounts of cleavage product from the gels shown above. Mean of 2 independent experiments. (C) Normalized FCS autocorrelation curve obtained in the nucleus of HeLa OGG1 KO cells expressing the GFP dimer. Median of 12 cells. The experimental curve (black) is fitted with a simple diffusion model (red).

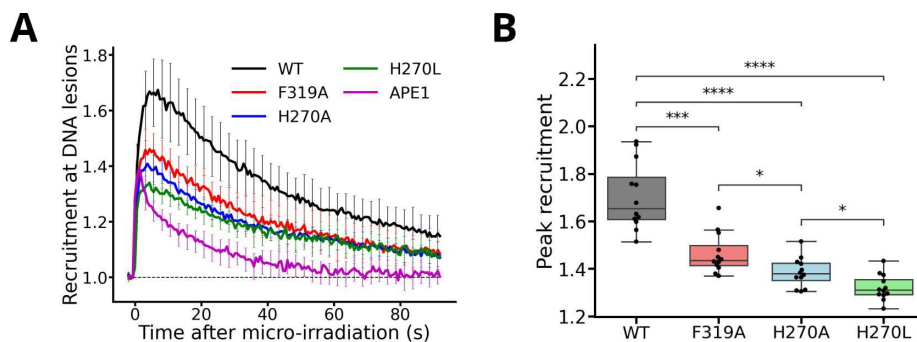


Figure SP3. Recruitment kinetics of OGG1 mutants and APE-1 at sites of laser micro-irradiation. (A) Curves of the recruitment kinetics for GFP-tagged OGG1-WT, F319A, H270A, H270L and AP-endonuclease APE1 expressed in HeLa OGG1 KO cells. 12 cells per condition. (B) Peak recruitment extracted from the curves shown in A for OGG1-WT, F319A, H270A and H270L.

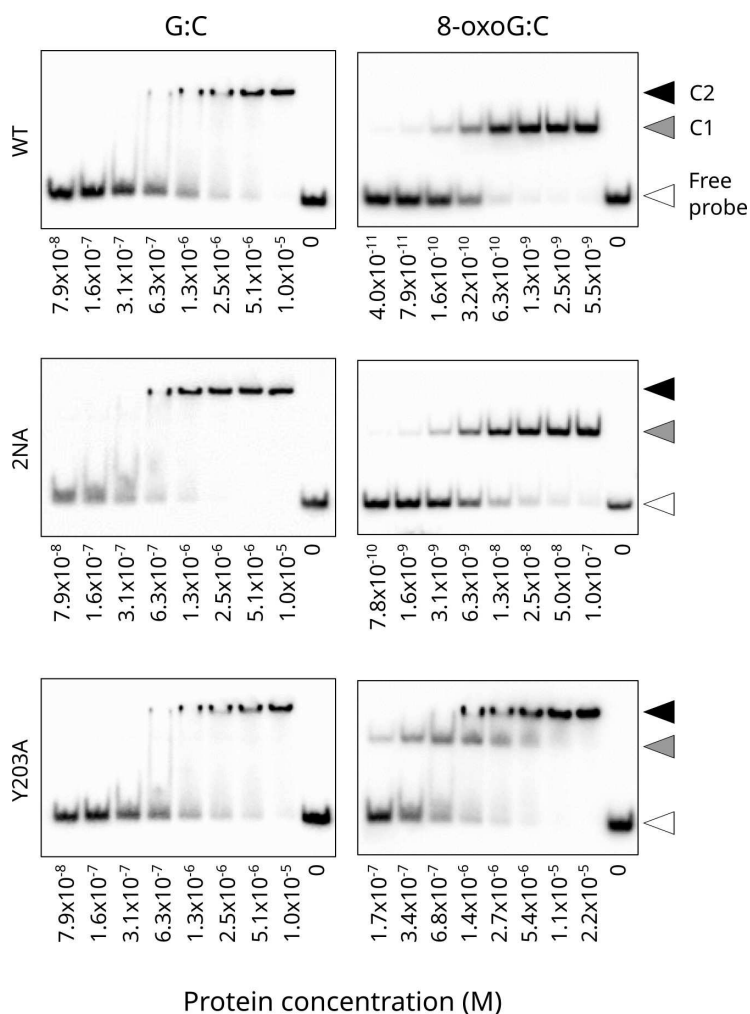


Figure SP4. DNA binding properties of purified OGG1-WT, OGG1-N149A/N150A (2NA) and OGG1-Y203A. Representative gel-shifts showing the binding of purified OGG1-WT, OGG1-N149A/N150A (2NA) and OGG1-Y203A to radiolabeled DNA duplexes free of lesion (G:C) or containing an 8-oxoG:C pair (8-oxoG:C). The protein concentrations are shown below the gels. The protein/DNA complexes C1 and C2 are defined in the caption of figure 5.

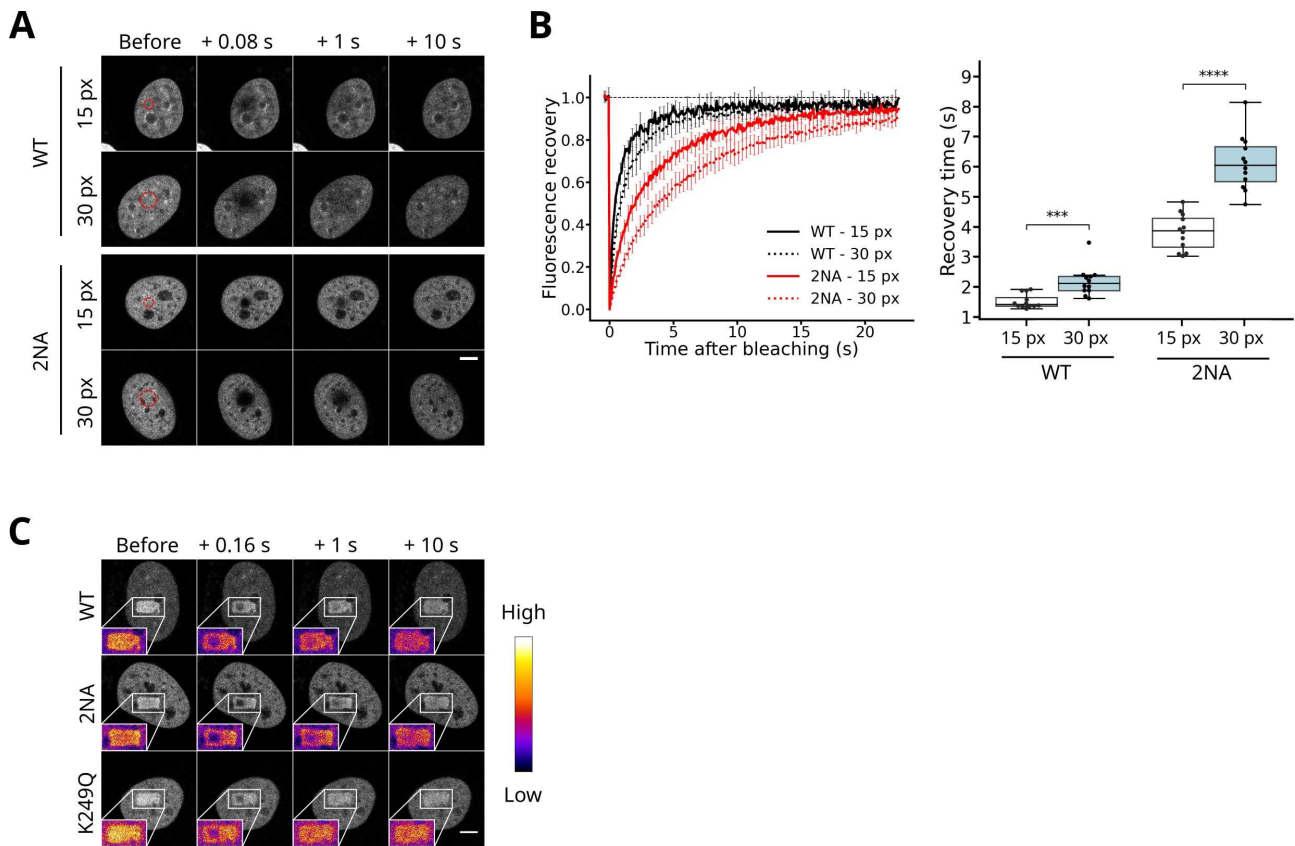


Figure SP5. Nuclear dynamics of the OGG1-N149A/N150A (2NA) mutant in the absence of external damage and at sites of laser micro-irradiation. (A) Representative time-course images of the fluorescence recovery after photobleaching of circular area of variable sizes within the nucleus of HeLa OGG1 KO cells expressing GFP-tagged OGG1-WT or OGG1-2NA. The bleached regions of 15 and 30 pixel diameters are shown with red dashed circles. Scale bar: 5 μ m. (B) Left: Normalized fluorescence recovery curves for GFP-tagged OGG1-WT and OGG1-2NA obtained from the images shown in A. Right: Characteristic recovery times estimated from the fit of the curves. 12 cells per condition. (C) Representative time-course images of the fluorescence recovery after photobleaching a sub-region of the area subjected to laser micro-irradiation within the nucleus of HeLa OGG1 KO cells expressing GFP-tagged OGG1-WT, OGG1-2NA or OGG1-K249Q. Insets in pseudocolor show a magnified view of the micro-irradiated region. Scale bar: 5 μ m.

II. Impact de la reconnaissance de la cytosine sur la dynamique d'OGG1

La majorité du Matériels et Méthodes a été présentée dans le manuscrit d'article inclus dans cette thèse, et ne sera donc pas répétée ici. Toutes les expériences ont été réalisées sur le même microscope LSM 880 de Zeiss, la fluorescence excitée et collectée comme mentionné dans le papier. Seules les différences dues à des optimisations ou des ajustements suite aux dérives du systèmes seront présentées. Les acquisitions de FCS ont été réduites à 20 sec pour éviter la contamination des traces par des composantes lentes qui rendent l'analyse de courbes plus compliquée et bruitée. La zone d'induction de dommages par micro-irradiation est un rectangle de 55 pixels par 25. Les autres paramètres n'ont pas été changés.

1. Caractérisation du motif conservé NNN

Le motif NNN, comprenant les acides aminés N149, N150 et N151 est très conservé au cours de l'évolution (Figure 16), suggérant donc qu'il joue un rôle important dans le fonctionnement de l'ADN-glycosylase. Malgré cela, il est très peu caractérisé, et les seules données existantes proviennent d'études structurales, ne donnant que peu d'informations sur le fonctionnement de ce motif dans le contexte cellulaire. D'après une étude récente, durant la phase de recherche de la lésion, le résidu N149 contacterait simultanément la guanine (indépendamment de son état d'oxydation) et la cytosine placée en regard, initiant ainsi l'extrusion de la première [Shigdel *et al.*, 2020] (le mécanisme complet de la reconnaissance au clivage est décrit dans la partie II. 2. b. du Chapitre 2). Les autres nucléotides (A, T et C) sur le brin cible, et la paire 8-oxoG:A ne sont pas positionnés de sorte à permettre ces contacts, assurant ainsi la spécificité pour la paire G/8-oxoG:C. Le niveau d'oxydation de la guanine est testé par la suite. Le résidu N149 établit également des contacts le résidu Y203, étudié dans la première partie des résultats (Figures P5, P6) [Shigdel *et al.*, 2020], suggérant qu'ils puissent travailler de concert à la reconnaissance de la lésion. Durant la phase de recherche, le résidu N151 contacte le brin-non cible de l'ADN, à trois bases en 3' de la cytosine [Shigdel *et al.*, 2020]. Aucun contact particulier n'est mis en avant par l'étude pour le résidu N150, mais étant donné l'impact de la double mutation N149A/N150A (2NA) sur la dynamique d'OGG1 présenté précédemment (Figure P6), il semble évident que ce résidu joue aussi un rôle important durant la phase de recherche de la lésion. Une fois la base extrudée, le résidu N149 vient combler le vide laissé par la 8-oxoG ou la guanine normale. Les résidus N150 et N151 contactent

alors le pentose en 3' de la G/8-oxoG et la base directement en 5' de la G/8-oxoG, respectivement [Shigdel *et al.*, 2020].

C'est dans le but de pallier au manque de données sur ce motif NNN que le mutant N149A/N150A, étudié dans le manuscrit joint ci-dessus, a été généré. S'il a en effet permis d'élucider un certain nombre de points, il a également soulevé de nouvelles questions : i) est ce que l'une des deux mutations a un impact plus fort que l'autre, et si oui laquelle ? ii) Est-ce qu'à l'inverse les trois simples mutants pourraient avoir des comportements similaires ? iii) Quelles sont les dynamiques et cinétiques de recrutement des deux autres doubles mutants N149A/N151A et N150A/N151A ? Peut-on s'attendre à des résultats similaires au mutant N149A/N150A ? iv) Qu'en est-il du triple mutant N149A/N150A/N151A ? Afin de répondre à ces questions, les trois mutants simples N149A, N150A et N151A ont été générés, ainsi que le triple mutant N149A/N150A/N151A (3NA), et les deux doubles mutants N149A/N151A et N150A/N151A. Malheureusement, faute de temps, ces deux doubles mutants n'auront pas été étudiés durant ma thèse. L'étude par FCS de la dynamique des trois simples mutants N149A, N150A et N151A, ainsi que du triple mutant 3NA ne montre pas de différences drastiques avec le WT. Le N150A et le 3NA semblent légèrement plus lents que le WT (Figure 46A-B), mais ce n'est rien en comparaison du ralentissement observé pour le 2NA (Figure P6). Par ailleurs, ces résultats ne sont pas reproductibles, soulignant d'autant plus le faible impact de ces mutations sur la dynamique de recherche de la 8-oxoG d'OGG1. Le fait que le 3NA présente une dynamique similaire à celle du WT alors que le 2NA est très lent suggère que la double mutation perturbe fortement une interaction du résidu N151 avec l'ADN, possiblement suite à une rotation de ce dernier. Sa mutation permettrait alors de supprimer cette interaction aberrante et donc de rétablir la dynamique d'OGG1. Par la suite, j'ai testé l'impact de ces mutations sur la capacité d'OGG1 à être recrutée puis relarguée de la zone de dommages après micro-irradiation. De même que ce qui avait pu être observé en FCS, les simples mutations N149A, N150A et N151A n'ont pas d'impact significatif sur le profil de recrutement de l'ADN-glycosylase : on ne peut pas voir de différences majeures dans les amplitudes maximales de recrutement, et si de légères différences de relargage peuvent être notées (Figure 46C-D), elles ne sont, ici non plus, pas reproductibles. A l'inverse, le 3NA a un impact marqué sur le recrutement d'OGG1, avec un profil très similaire à celui observé pour le 2NA : il est plus faiblement recruté, et son relargage est compromis (Figure 46C-D). Ainsi, si muter le troisième résidu du motif a un effet très fort en terme de dynamique de recherche en comparaison du 2NA, il semble négligeable quant à la cinétique de recrutement d'OGG1. Il semblerait donc que le motif NNN soit essentiel à l'excision de la 8-oxoG plutôt qu'à sa recherche, soit de par son interaction directe avec cette dernière, soit avec la cytosine ou l'ADN.

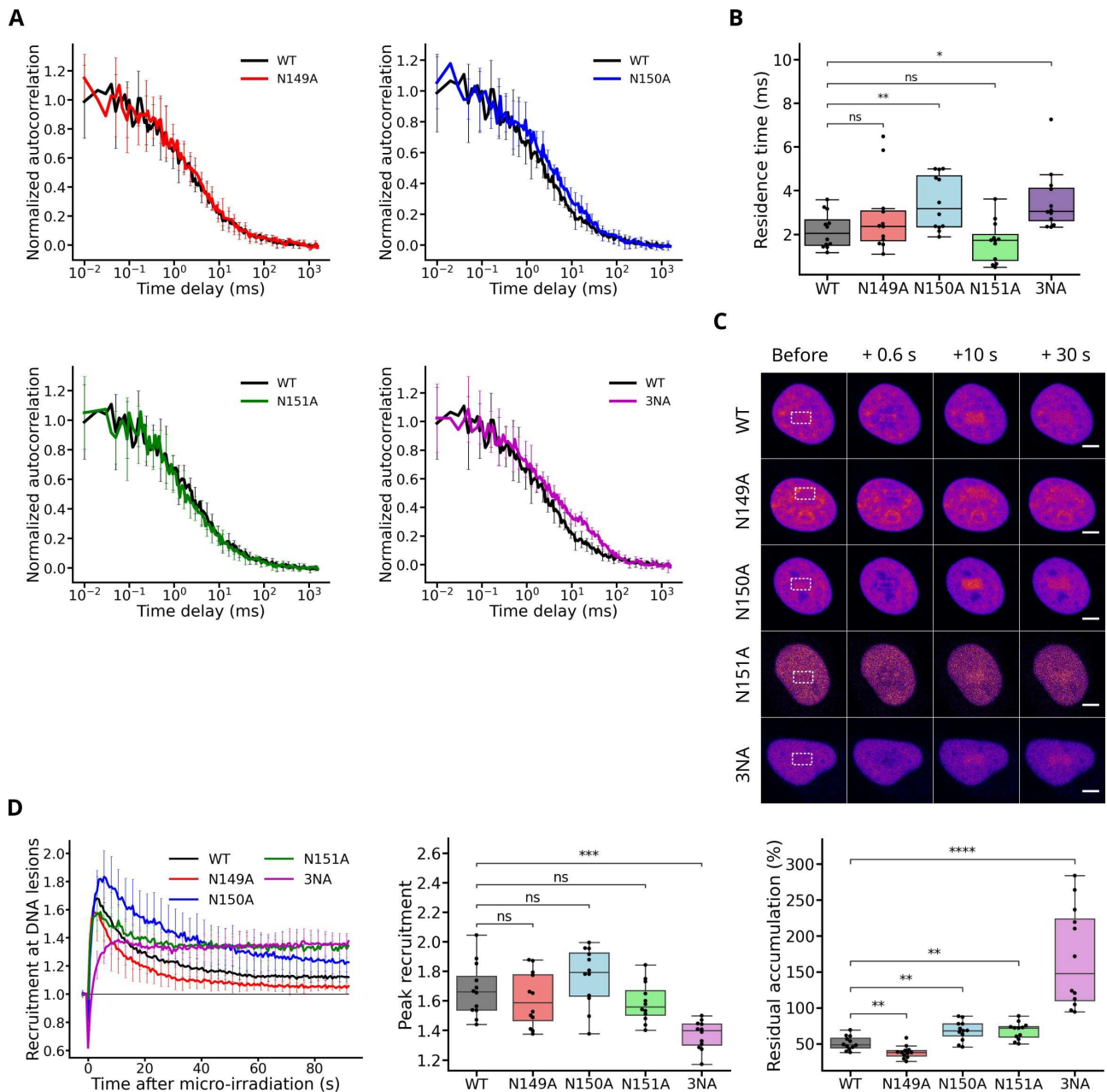


Figure 46: Impact des mutations du motif NNN sur la dynamique et la cinétique de recrutement d'OGG1. **A.** Courbes d'autocorrélation normalisées de FCS pour les mutants N149A, N150A, N151A et 3NA, en comparaison avec OGG1 WT. 12 cellules par condition. **B.** Temps caractéristiques de résidence dans le volume confocal obtenus à partir du fit des courbes présentées en A. **C.** Images représentatives de l'accumulation des différents variants d'OGG1 après induction de dommages par micro-irradiation. Les zones en pointillés blancs indiquent les régions micro-irradiées. **D.** Gauche : Cinétiques de recrutement pour OGG1 WT, N149A, N150A, N151A et 3NA aux zones micro-irradiées, obtenues à partir des images montrées en C. Milieu : Recrutement maximal extrait à partir des courbes de recrutement. Droite : Accumulation résiduelle extraite à partir des courbes de recrutement. 12 cellules par condition.

2. Étude de l'implication des arginines R154 et R204 dans la reconnaissance de la cytosine et l'interaction avec l'ADN

Comme évoqué à plusieurs reprises, OGG1 n'excise la 8-oxoG que lorsqu'elle est appairée à une cytosine, afin d'éviter d'amplifier le processus mutagène [Radicella *et al.*, 1997]. Cette sélectivité implique donc une reconnaissance de la cytosine au même titre que la 8-oxoG. Dès l'étude du laboratoire de Verdine en 2000, les auteurs ont noté que quatre résidus d'OGG1, N149, R154, Y203 et R204, contactaient directement la cytosine lorsque la 8-oxoG était extrudée [Bruner *et al.*, 2000]. Le rôle de ces AA a été assez peu étudié, en particulier en cellules. L'étude de deux de ces résidus, N149 et Y203, a déjà été détaillée à travers les résultats présentés dans le manuscrit d'article et dans la partie précédente. Cette partie sera donc consacrée à l'étude des arginines R154 et R204.

Ces deux AA ont d'abord été montrés comme stabilisant la cytosine lors de l'extrusion de la 8-oxoG [Bruner *et al.*, 2000], mais il a été plus récemment proposé que durant la phase de recherche, ces deux arginines n'interagissaient pas directement avec la cytosine, mais contactaient le brin non-cible à deux nucléotides en 3' de la cytosine [Shigdel *et al.*, 2020]. Cela n'invalide pas pour autant leur implication dans la reconnaissance de la cytosine, au moins pour R154. En effet, le mutant R154H, retrouvé dans certains cancers humains, montre une perte de sélectivité pour la paire 8-oxoG:C, et est capable d'exciser la 8-oxoG face à n'importe quelle base avec des efficacités similaires [Audebert *et al.*, 2000 ; Bruner *et al.*, 2000]. De plus, comme mentionné dans l'introduction, la protéine bactérienne CacOGG qui possède une méthionine à la place d'une de R154 présente une sélectivité décriée pour la cytosine, partiellement restaurée par sa mutation en arginine [Robey-Bond *et al.*, 2008]. Je n'ai toutefois pas pu trouver de littérature plus précise quant au rôle de R204 en amont de l'extrusion d'OGG1.

Afin de mieux comprendre l'implication de ces deux résidus dans le fonctionnement d'OGG1, les deux simples mutants R154A et R204A et le double mutant R154A/R204A (2RA) ont été générés. Leur dynamique en l'absence de dommages induits a tout d'abord été étudiée par FCS (Figure 47A). Il est très intéressant de voir que les deux simples mutants R154A et R204A sont tous deux légèrement plus rapides que le WT et ont des dynamiques extrêmement similaires entre elles, avec des temps de résidence dans le volume confocal de ~0.9 ms (contre ~1.3 pour le WT) (Figure 47A). Le double mutant quant à lui est le plus rapide de tous, avec un temps de résidence de ~0.6 ms (Figure 47A), ce qui suggère un effet cumulatif des deux mutations. L'accélération de ces mutants en comparaison du WT suggère une interaction avec l'ADN réduite, similairement à ce qui avait pu être observé pour le G245A (Figure P4).

Après induction de dommages, on peut voir que les deux mutants R154A et R204A ont une amplitude de recrutement légèrement diminuée par rapport au WT et sont relargués normalement (Figure 47B-C). Le double mutant quant à lui présente un effet très fort, avec un recrutement presque complètement aboli (Figure 47B-C). La faible proportion recrutée ne semble pas être relarguée, mais vu la faible amplitude du recrutement il est difficile de différencier une absence de relargage d'un artefact, d'autant plus que ce recrutement se situe au même niveau que le WT et les deux simples mutants après relargage (Figure 47C). Le recrutement légèrement diminué des mutants R154A et R204A suggère que muter une seule de ces deux arginines diminue légèrement la capacité d'OGG1 à reconnaître la cytosine, mais sans que cela ait un impact dramatique, ni sur la recherche de la 8-oxoG, ni sur le recrutement à la zone de dommages. Cependant, la double mutation impacte très

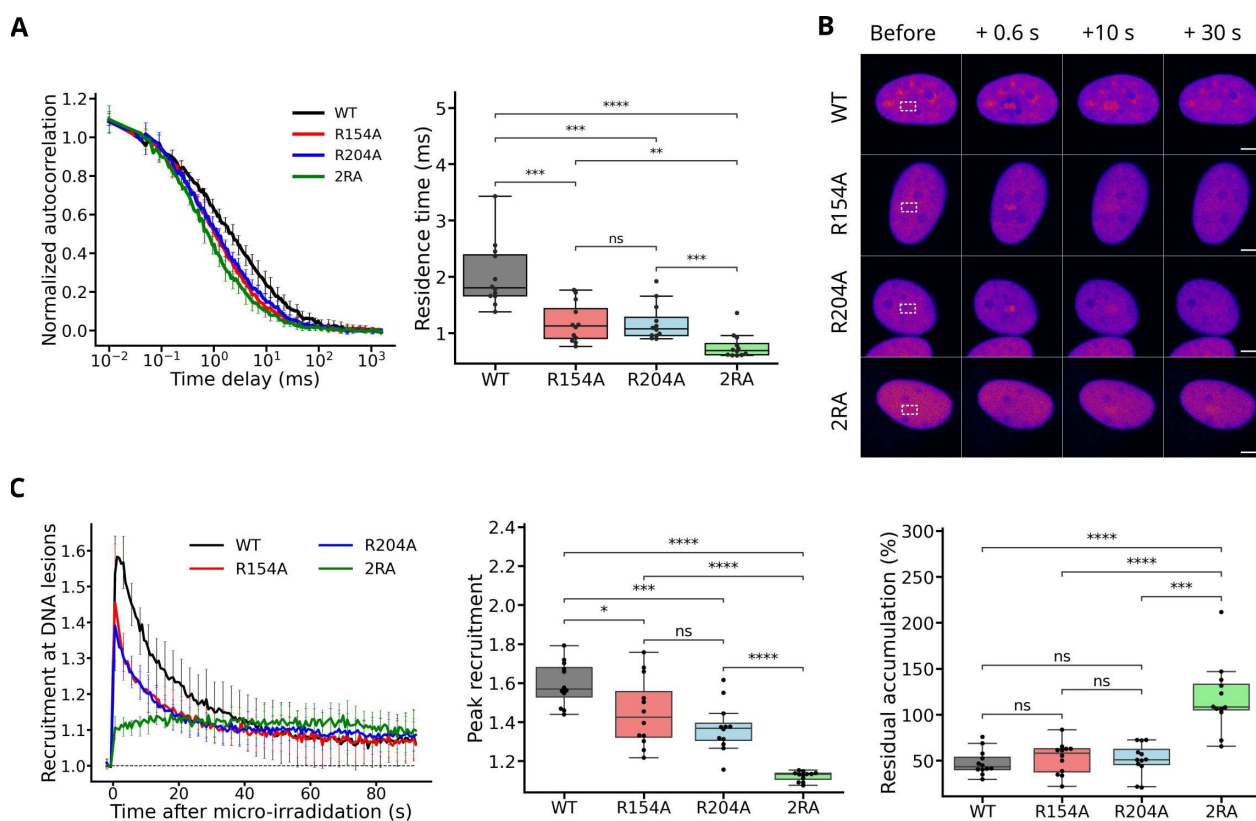


Figure 47: Implication des arginines R154 et R204 dans la dynamique et le recrutement d'OGG1. A. Gauche : Courbes d'autocorrélation normalisées de FCS pour OGG1 WT, R154A, R204A et 2RA. Droite : Temps caractéristiques de résidence dans le volume confocal obtenus à partir du fit des courbes. 12 cellules par condition. **B.** Images représentatives de l'accumulation des différents variants d'OGG1 après induction de dommages par micro-irradiation. Les zones en pointillés blancs indiquent les régions micro-irradiées. **C.** Gauche : Cinétiques de recrutement pour OGG1 WT, R154A, R204A et 2RA aux zones micro-irradiées, obtenues à partir des images montrées en C. Milieu : Recrutement maximal extrait des courbes de recrutement. Droite : Accumulation résiduelle extraite à partir des courbes de recrutement. 12 cellules par conditions.

fortement ces deux fonctions, possiblement du fait d'une interaction avec l'ADN très perturbée, ce qui serait cohérent avec le fait que, durant la phase de recherche de la lésion, R154 et R204 contactent le squelette du brin non-cible et non la cytosine directement [Shigdel *et al.*, 2020].

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ADN est en permanence soumis à toutes sortes de stress, exogènes comme endogènes, menaçant son intégrité, et ainsi la viabilité de la cellule, voire de l'organisme. Pour y faire face, la cellule dispose de tout un arsenal de voies de réparation, adaptées à chaque type de lésion. L'une des plus fréquentes d'entre elles est une forme oxydée de la guanine, la 8-oxoguanine, dont la réparation par excision de base est initiée par sa reconnaissance par l'ADN-glycosylase OGG1. Si sa structure et son mode de reconnaissance de la 8-oxoG ont été finement caractérisés *in vitro* [Bruner *et al.*, 2000 ; van der Kemp *et al.*, 2004 ; Banerjee *et al.*, 2005 ; Dunn *et al.*, 2011 ; Shigdel *et al.*, 2020], peu de données existent quant à la dynamique d'OGG1 en cellules vivantes [D'Augustin *et al.*, 2020].

Les objectifs de ma thèse se divisaient donc en deux buts principaux, intrinsèquement liés. Le premier était de caractériser la dynamique d'OGG1 au sein du noyau en à la fois en l'absence et en présence de dommages induits ; le second d'identifier les résidus d'OGG1 essentiels à chacune de ces étapes en se basant sur les données de structures et *in vitro* déjà existantes. Pour cela, j'ai adapté à l'étude d'OGG1 des techniques de microscopie déjà présentes au laboratoire.

La dynamique d'OGG1, comme de toute protéine à la recherche d'une cible dans l'ADN, peut être divisée en deux phases : tout d'abord la phase de recherche de la cible, donc de la 8-oxoG dans le cas d'OGG1, puis, la phase d'association spécifique lorsque la cible a été trouvée. Ces deux processus sont fondamentalement liés, l'association spécifique avec la lésion étant la continuité directe de sa recherche. Toutefois, du fait des techniques utilisées durant ma thèse leur étude a été découplée.

I. Phase de recherche de la lésion

1. Régime dynamique d'OGG1

De même qu'un grand nombre de protéines à la recherche d'une cible spécifique dans l'ADN, OGG1 fait face à un défi paradoxal, voulant que la détection de la lésion soit à la fois rapide et spécifique. De nombreuses études *in vitro* ont montré que pour y répondre OGG1 utilisait la diffusion facilitée, alternant ainsi les phases d'interaction aspécifique avec l'ADN (glissement ou *hopping*) et de diffusion 3D au sein du nucléoplasme [Blainey *et al.*, 2006, 2009 ; Rowland *et al.*, 2014 ; Vestergaard, *et al.*, 2018]. Toutefois, les études en cellules confirmant ces données et caractérisant le régime spécifique (diffusion-limité, réaction-limité ou mixte) dans lequel se trouve OGG1 manquent encore. Durant ma thèse, j'ai associé des approches de FRAP et FCS afin d'étudier la dynamique d'OGG1 en l'absence de dommages induits, ce qui a permis de montrer qu'OGG1 interagit transitoirement avec l'ADN durant sa recherche de la 8-oxoG, et suit un régime mixte, les

durées caractéristiques des deux états (lié et diffusif) étant du même ordre de grandeur (Figure P1). Ainsi, confirmant les données *in vitro* sur de l'ADN nu, ces données en cellules montrent que l'interaction avec l'ADN joue une part importante dans la dynamique de recherche d'OGG1. Toutefois, la résolution de nos techniques ne permet pas d'étudier les différents états possibles de la liaison d'OGG1 à l'ADN qui ont pu être proposés d'après les études *in vitro*, que ce soit diffusion 1D le long de l'ADN ou *hopping* [Blainey *et al.*, 2006 ; Rowland *et al.*, 2014], ni d'observer le glissement rotationnel mis en évidence sur de l'ADN nu [Blainey *et al.*, 2009]. Des approches utilisant des techniques de molécule unique, telles que le SPT, pourraient aider à répondre à ces questions.

2. Implication de la reconnaissance de la 8-oxoguanine et de la cytosine dans la phase de recherche

a. Reconnaissance de la 8-oxoguanine

Un niveau basal de 8-oxoG est toujours présent dans les cellules, même en l'absence de dommages induits. Par ailleurs, des résultats précédents du laboratoire ont montré qu'un mutant d'OGG1 incapable de reconnaître la lésion, OGG1(F319A), était malgré tout retenu à la fraction chromatinienne après un stress oxydant chimique [Amouroux *et al.*, 2010]. Il était par conséquent important de vérifier l'éventuelle implication de la reconnaissance de la 8-oxoG dans la dynamique d'OGG1, et en particulier si les interactions avec l'ADN observées pour la protéine sauvage étaient dépendantes de sa capacité à détecter la 8-oxoG. Pour cela, les mutants F319A et H270A, précédemment caractérisés *in vitro* et incapables de détecter la 8-oxoG [van der Kemp *et al.*, 2004], ont été étudiés par FCS en l'absence de dommages induits. L'absence d'impact des mutations F319A et H270A sur la dynamique d'interaction entre OGG1 et l'ADN estimée grâce à la mesure du temps de résidence par FCS (Figure P1C) suggère que la reconnaissance de la 8-oxoG n'est pas l'étape limitante dans la dynamique du processus. Ainsi, l'interaction avec l'ADN observée pour OGG1 est bien caractéristique d'une liaison non-spécifique et transitoire, probablement liée à la recherche de la lésion (diffusion 1D ou *hopping*), et non d'une interaction spécifique avec un niveau basal de 8-oxoG.

b. Reconnaissance de la cytosine

La cytosine faisant face à la 8-oxoG étant elle aussi spécifiquement identifiée par OGG1 lors de sa recherche des lésions, sa reconnaissance pourrait avoir un impact sur la dynamique de l'ADN-glycosylase. Quatre résidus ont été proposés comme ayant un rôle dans la spécificité d'OGG1 pour la cytosine : N149, R154, Y203 et R204 (Figure 48) [Bruner *et al.*, 2000]. La caractérisation biochimique

du mutant R154H [Audebert *et al.*, 2000 ; Bruner *et al.*, 2000], ainsi que l'étude de la protéine bactérienne CacOGG [Robey-Bond *et al.*, 2008] a permis de confirmer l'implication des résidus R154 et Y203 dans la reconnaissance de la cytosine. A ma connaissance, aucune donnée n'existe sur les résidus N149 et R204 en dehors des études structurales. Les résidus N149 et Y203 sont un petit peu à part car les études structurales montrent qu'ils interagissent directement avec les deux bases G/8-oxoG et C (à différentes étapes de l'extrusion cependant), mais également entre eux (Figure 48) [Bruner *et al.*, 2000 ; Shigdel *et al.*, 2020]. A ce titre, ils seront discutés dans la prochaine section. Par conséquent, cette partie se focalise sur les arginines R154 et R204.

Il est intéressant de noter que trois des mutants supposément incapables de reconnaître la cytosine, à savoir R154A, R204A et R154A/R204A (2RA) sont plus rapides que la protéine WT (Figure 47A). Ces données, en parallèle de celles obtenues sur les mutants F319A et H270A, suggèrent que l'étape qui prend le plus de temps est la reconnaissance de la cytosine appairée à la G/8-oxoG, plutôt que la distinction entre G et 8-oxoG. Cette hypothèse serait cohérente avec le fait que Shigdel et ses collaborateurs notaient que durant la phase de recherche de la lésion, OGG1 ne forme pas de contact spécifique ni avec la G, ni avec la 8-oxoG ; ce qui les menait à se demander

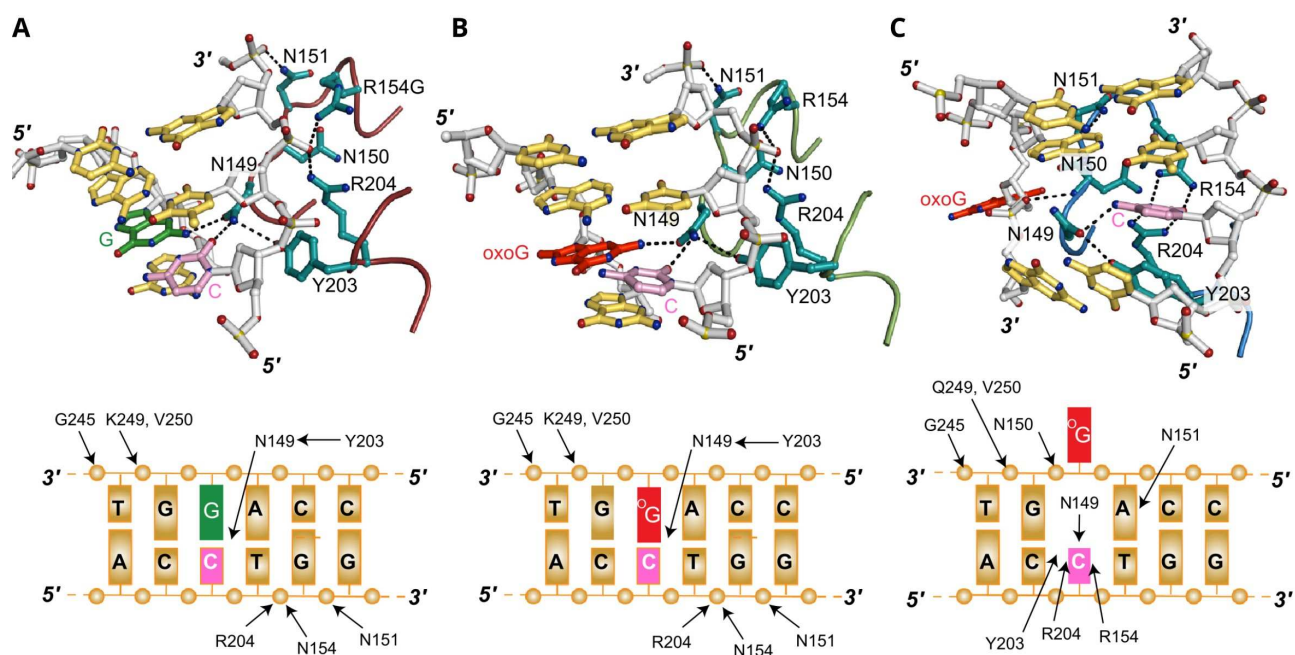


Figure 48: Interactions entre OGG1 et l'ADN à différentes étapes de la recherche de la 8-oxoG. L'ADN est représenté en gris, avec les bases en jaune, la G est en vert, la C en rose et la 8-oxoG en rouge. Les chaînes latérales des résidus d'intérêt sont en bleu, et les interactions avec l'ADN ou entre résidus symbolisés par des pointillés (panel du haut) ou des flèches (panel du bas). **A.** Phase de recherche, avec une paire G:C. **B.** Phase de recherche, avec une paire 8-oxoG:C. **C.** Reconnaissance de la paire 8-oxoG:C, dont la 8-oxoG est extrudée. Adapté de Shigdel *et al.*, 2020.

comment la base était discriminée dans les étapes précoces de la reconnaissance (Figure 48) [Shigdel *et al.*, 2020]. Ils n'ont toutefois pas abordé la question sous l'angle de la reconnaissance de la cytosine. Alternativement, cela pourrait vouloir dire qu'à partir du moment où une cytosine localisée sur le brin non cible est identifiée, la base lui faisant face serait au moins partiellement extrudée ; ce qui pourrait confirmer l'hypothèse selon laquelle la discrimination entre G et 8-oxoG a lieu hors de la double hélice [Banerjee *et al.*, 2005]. Cependant, l'étude de Shigdel et ses collaborateurs montre que les arginines R154 et R204 ne contactent pas directement la cytosine durant la phase de recherche, mais uniquement le squelette du brin non-cible (Figure 48A-B) [Shigdel *et al.*, 2020]. Leur accélération en comparaison du WT pourrait donc être simplement due à un défaut d'interaction avec l'ADN (similairement à ce qui peut être observé pour le mutant G245A (Figure P4B)) et non un défaut de reconnaissance de la cytosine. Ces hypothèses sont toutes deux compatibles avec l'effet cumulatif observé pour le double mutant 2RA (Figure 47A).

c. Reconnaissance conjointe de la 8-oxoG et de la cytosine

Les études structurales et *in vitro* avaient proposé que, pour détecter la 8-oxoG, OGG1 sonde l'ADN grâce à l'insertion de la tyrosine Y203 au sein de la double hélice [Bruner *et al.*, 2000 ; Banerjee *et al.*, 2005, 2006 ; Dunn *et al.*, 2011]. Ce modèle a cependant été remis en cause plus récemment [Shigdel *et al.*, 2020]. Les auteurs suggèrent qu'au lieu de rentrer dans la double hélice pour sonder chaque paire de base, Y203 reste à la surface et stabilise le résidu N149, qui lui-même contacte à la fois la G/8-oxoG et la C (Figure 48A-B). Cela suggère que muter l'un ou l'autre de ces résidus devrait avoir un impact similaire sur la dynamique de recherche d'OGG1, puisque retirer le N149 empêcherait les contacts nécessaires à la reconnaissance de la G/8-oxoG:C, et retirer le Y203 déstabiliserait le N149, menant donc probablement à des conséquences similaires. Dans une certaine mesure, c'est en effet ce que l'on observe, dans le sens où aucune des deux mutations N149A et Y203A n'affecte la dynamique de recherche de l'ADN (Figure P6A) (Figure 46). Cette absence d'impact est cependant assez inattendue pour des altérations sur des résidus contactant directement l'ADN et/ou la paire de base cible. Il serait intéressant de voir l'impact d'un double mutant N149A/Y203A sur la dynamique de recherche de la protéine.

Par ailleurs, le résidu N149 faisant partie du motif NNN, il paraît pertinent de s'intéresser aux deux autres résidus du motif, N150 et N151. Les simples mutants N150A et N151A n'ont pas d'impact significatif sur la dynamique d'OGG1 en l'absence de dommages induits, de même que le triple mutant 3NA (Figure 46A-B) ; et les légères différences visibles sur cette figure ne sont pas reproductibles. A l'inverse, le double mutant N149A/N150A (2NA) a un effet drastique sur cette dynamique (Figure P6B). La différence entre le 2NA et le 3NA est assez surprenante. En effet, si l'on ne s'attend pas nécessairement à un tel ralentissement du 2NA en comparaison des mutants simples qui n'ont pas d'effet sur la dynamique d'OGG1, un effet cumulatif des deux mutations n'est pas totalement inattendu non plus. Par contre, retrouver une dynamique similaire à celle de la protéine WT en ajoutant la mutation N151A à la double mutation N149A/N150A est beaucoup plus surprenant. Ce résultat suggère que la double mutation perturbe fortement les interactions entre OGG1 et l'ADN, ce qui ralentirait la protéine, possiblement suite à un changement d'orientation du N151. A l'inverse, muter ce dernier AA supprimerait cette interaction perturbée avec l'ADN, et permettrait en quelque sorte de rétablir la dynamique d'OGG1. Toutefois, les données de structure prédite (via AlphaFold) ne vont pas dans ce sens car le résidu N151 n'est que très peu pivoté dans le cas du 2NA par rapport au WT (Figure 49). Cependant, il est à noter qu'on ne peut pas indiquer à AlphaFold de structure PDB spécifique comme référence pour la prédiction, et qu'il se base une structure ayant la 8-oxoG extrudée ; qui ne correspond donc pas nécessairement à la position des AA durant la phase de recherche.

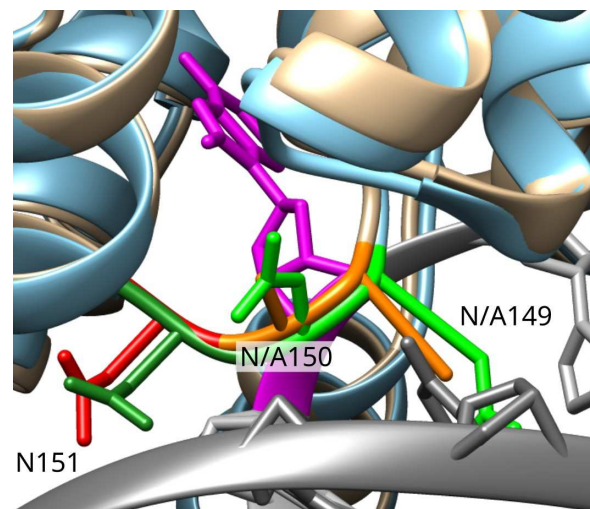


Figure 49: Vue rapprochée sur le motif NNN pour OGG1 WT (bleu) et 2NA (doré). Gris : ADN, Magenta : 8-oxoG (extrudée), Vert : Motif NNN WT, Orange : A149 et A150, Rouge : N151 (2NA). Structure WT : PDB 6w0m ; Structure 2NA : prédiction AlphaFold.

3. Résidus d'OGG1 impliqués dans l'interaction avec l'ADN

Comme mentionné précédemment, l'interaction d'OGG1 avec l'ADN constitue une part important de sa dynamique de recherche de la 8-oxoG, alors que la détection de cette dernière n'est pas impliquée dans sa recherche. Un premier résidu dont l'implication dans cette dynamique avait été suggérée dès les premières études structurales est la glycine 245 [Bruner *et al.*, 2000]. Elle fait

partie du motif HhH d'OGG1 et est supposée médier l'interaction entre OGG1 et l'ADN. C'est en effet ce que l'on observe, à la fois *in vitro* et en cellules, où muter cet acide aminé accélère significativement la dynamique d'OGG1 au sein du noyau en comparaison du WT, et bloque toute rétention de la protéine mutante sur l'ADN *in vitro* (Figure P4A-B). Toutefois, il est à noter que le mutant G245A reste beaucoup plus lent que la GFP2 ou même la GFP5, avec un temps de résidence d'environ 1.5 ms, contre ~0.3 et ~0.7 ms pour la GFP2 et la GFP5, respectivement. Ceci suggère que même si le résidu G245 est incontestablement essentiel à la bonne interaction entre OGG1 et l'ADN, il n'est pas le seul responsable de cette interaction et d'autres AA jouent également un rôle important. Un certain nombre avaient été proposés lors de l'étude du laboratoire de Verdine, dont entre autres les 3 résidus du motif NNN, N149, N150 et N151, les deux arginines R154 et R204, et la tyrosine 203. Ceux-ci jouent également des rôles importants dans la spécificité d'OGG1 pour la paire de base 8-oxoG:C. Ils ont été étudiés durant ma thèse, et ont déjà été discutés. Enfin, deux derniers résidus susceptibles d'intervenir dans la médiation de l'interaction entre OGG1 et l'ADN sont les résidus R197 et Y207. De même que le G245, ils avaient été identifiés dès l'étude structurale de 2000 [Bruner *et al.*, 2000], mais à ma connaissance, ces résidus n'ont jamais été étudiés depuis. Il serait donc intéressant de les muter afin de voir l'impact de telles mutations sur le comportement d'OGG1.

II. Mécanismes impliqués dans la cinétique de recrutement et relargage d'OGG1 après induction de dommages

1. Implication de la reconnaissance de la 8-oxoG et de la cytosine dans le recrutement d'OGG1

a. Reconnaissance de la 8-oxoguanine

De précédents résultats du laboratoire ont montré que le mutant OGG1(F319A) était retenu à la chromatine après un stress oxydant global de façon similaire à la protéine WT [Amouroux *et al.*, 2010]. Toutefois, après induction de dommages de façon plus brève et localisée par micro-irradiation laser, on note une forte diminution de l'amplitude de recrutement des trois mutants F319A, H270A et H270L (Figures P3, SP2), tous incapables de reconnaître la 8-oxoG:C *in vitro* (Tableau 5) [van der Kemp, *et al.*, 2004]. De plus, des résultats similaires sont obtenus lors de l'utilisation d'un inhibiteur compétitif d'OGG1 (Figure P3). Cette baisse de recrutement correspond donc à la part liée à la reconnaissance de la 8-oxoG. Cependant, conformément à ce qui avait été obtenu avec un stress

chimique [Amouroux *et al.*, 2010], l'incapacité à détecter la 8-oxoG est loin d'abolir complètement le recrutement d'OGG1, suggérant l'intervention d'autres mécanismes dans le recrutement d'OGG1.

b. Reconnaissance de la cytosine

La reconnaissance de la cytosine étant elle aussi nécessaire au bon fonctionnement d'OGG1, je me suis également intéressée à l'impact de mutations prédites pour affecter cette reconnaissance et portant sur les résidus N149, R154, Y203 et R204. Comme précédemment, les effets des mutations portant sur N149 et Y203 seront traitées dans un second temps. En ce qui concerne les deux arginines R154 et R204, leurs mutations en alanines ont des effets extrêmement similaires entre elles (Figure 47B-C), suggérant donc qu'elles ont des rôles similaires également. En effet, ces deux mutants R154A et R204A présentent tous deux un recrutement maximal plus faible que la protéine WT, ce qui rappelle la diminution observée pour les mutants incapables de reconnaître la 8-oxoG, mentionnés précédemment. Ainsi, bloquer la capacité à reconnaître la 8-oxoG ou la cytosine semble avoir des effets similaires sur la capacité d'accumulation d'OGG1 sur les dommages induits par micro-irradiation laser. Par ailleurs, la perte de recrutement presque totale en cas de double mutation des arginines suggère que ces deux résidus ont des rôles au moins partiellement redondants. Cette interprétation resterait toutefois à confirmer par l'analyse en gel retard des mutants R154A et R204A, afin de vérifier leur perte de spécificité pour la paire 8-oxoG:C.

c. Reconnaissance conjointe de la 8-oxoG et de la cytosine

Comme indiqué précédemment, les résidus N149 et Y203 sont supposés être impliqués à la fois dans la reconnaissance de la 8-oxoG, et dans celle de la cytosine lui faisant face. Le N149 est supposé établir des contacts spécifiques avec la G/8-oxoG et la C, permettant l'extrusion de la G/8-oxoG dans l'exo-site et la stabilisation de la cytosine. Toutefois, la seule mutation N149A n'impacte pas la cinétique de recrutement d'OGG1 (ni sa dynamique de recherche) (Figure 46), suggérant que cet AA seul n'est pas essentiel. A l'inverse, la mutation Y203A abolit presque complètement le recrutement d'OGG1 (Figure P6C-D). Indépendamment l'une de l'autre, l'incapacité à détecter la 8-oxoG (Figure P3A-B) ou la cytosine (Figure 47B-C) diminuent toutes deux partiellement le recrutement d'OGG1 en comparaison du WT. Y203 étant vraisemblablement impliqué dans la détection de la paire 8-oxoG:C (Figure P5) [Bruner *et al.*, 2000 ; Robey-Bond *et al.*, 2008 ; Shigdel *et al.*, 2020], il est possible que la forte diminution de recrutement du mutant Y203A soit liée à un effet cumulatif de sa perte de reconnaissance simultanée pour la 8-oxoG et la C. Il serait intéressant de vérifier la spécificité du mutant Y203A pour la paire 8-oxoG:C en gel retard et gel d'activité.

2. Reconnaissance d'autres types de dommages

La micro-irradiation ne permet pas d'induire un seul type de lésions, et génère un mélange de différents dommages dans l'ADN, avec, dans le meilleur des cas, une sur-représentation du dommage d'intérêt [Gassman & Wilson, 2015 ; Zentout *et al.*, 2021]. Il est donc très probable que l'on induise d'autres dommages pouvant constituer une cible pour OGG1, comme les FapyG ou les sites AP [van der Kemp *et al.*, 2004]. S'il est impossible d'évaluer l'induction de FapyG lors de la micro-irradiation du fait de l'absence d'anticorps ou d'enzyme spécifique uniquement à cette lésion, le recrutement d'APE1 suggère que l'on génère en effet des sites AP lors de la micro-irradiation laser (Figure SP2).

De plus, il a été montré que les trois mutants F319A, H270A et H270L étaient tout de même capables de lier, quoiqu'imparfaitement, un analogue des sites AP, le tetrahydrofuranyl (THF), appairé à une cytosine, ainsi que de l'exciser (Tableau 5) [van der Kemp *et al.*, 2004]. L'activité résiduelle de H270L pour le THF:C est la plus faible des trois mutants, et représente 27 % de l'efficacité d'excision du WT pour cette lésion (Tableau 5) [van der Kemp *et al.*, 2004]. Si cela peut paraître peu, c'est en réalité loin d'être négligeable en comparaison des activités mesurées pour la 8-oxoG et le FapyG (Tableau 5). Par conséquent, il est possible que le recrutement résiduel observé pour ces mutants après micro-irradiation soit lié, au moins en partie, à la reconnaissance des sites AP générés à ce moment-là. La différence entre les profils de recrutements d'APE1 et de ces mutants pourrait s'expliquer par le fait qu'APE1 est beaucoup plus affine qu'OGG1 pour les sites AP [Wilson *et al.*, 1995].

L'implication des FapyG dans le recrutement d'OGG1 est beaucoup plus compliquée à estimer, d'une part du fait de l'impossibilité de vérifier l'induction ou non de ces lésions ; et d'autre part, car le mécanisme de reconnaissance et d'excision du FapyG par OGG1 est beaucoup moins étudié que ceux de la 8-oxoG et des sites AP. Je n'ai malheureusement pas pu trouver de données concernant la capacité d'OGG1 WT à lier une section d'ADN comportant un FapyG.

Tableau 5: Affinité et activité d'OGG1 WT et des mutants F319A, H270A et H270L sur différentes cibles. ND : Non Déterminée, du fait de la liaison très transitoire entre les mutants et la paire 8-oxoG:C. D'après [van der Kemp et al., 2004](#).

	K_D 8-oxoG:C (nM)	K_D THF:C (nM)	Activité 8-oxoG:C (%)	Activité Fapy:C (%)	Activité THF:C (%)
WT	8.2 ± 0.9	2.4 ± 0.3	100	100	100
F319A	ND	2.2 ± 0.4	0.5	1.9	67
H270A	ND	4.6 ± 0.7	0.6	2.2	43
H270L	ND	14.8 ± 3.3	≤ 0.1	1.4	27

3. Implication de cofacteurs dans le recrutement d'OGG1

Cependant, une autre hypothèse pouvant aussi expliquer le recrutement de ces mutants est l'intervention de cofacteurs. En effet, plusieurs études ont récemment montré qu'OGG1 interagissait avec plusieurs facteurs de réparation appartenant à d'autres voies que le BER au niveau des zones de dommages. C'est en particulier le cas de protéines du NER, dont plusieurs protéines semblent avoir un rôle non canonique dans le BER [[Kumar et al., 2020a,b](#)]. Par exemple, XPC, l'un des premiers facteurs du NER dont l'implication dans le BER a été vérifiée, permet de stimuler l'activité d'OGG1 en présence d'ADN porteur de 8-oxoG, probablement en favorisant son relargage du site AP généré par le clivage de la 8-oxoG et pour lequel OGG1 a une forte affinité [[D'Errico et al., 2006](#)]. Depuis cette étude pionnière, un certain nombre d'autres facteurs du NER a été montré comme ayant un rôle dans le BER, appartenant aux deux familles principales du NER, XP et CS [[Parlanti et al., 2012](#) ; [Kumar et al., 2020b](#)]. C'est également le cas d'autres protéines du NER comme UV-DDB, qui est essentielle au bon recrutement d'OGG1 [[Kumar et al., 2022](#)] et stimule son taux d'échange (ainsi que ceux d'APE1 et MUTYH) [[Jang et al., 2019](#)]. L'implication grandissante de facteurs initialement attribués au NER dans le BER laisse penser que ces deux voies de réparation sont nettement moins séparées que ce qui avait été initialement imaginé [[Kumar et al., 2020a,b](#)].

Afin de tester l'étendue des protéines potentiellement impliquées dans la rétention d'OGG1 à la chromatine après induction de 8-oxoG, un crible par ARN d'interférence a été réalisé au laboratoire il y a quelques années. Il a permis de mettre en évidence qu'au moins 81 protéines étaient indispensables au recrutement et/ou à la rétention d'OGG1 à la chromatine après un stress oxydant

chimique, tandis que 87 autres permettent d'éviter une sur-accumulation d'OGG1 au niveau des dommages [Lebraud *et al.*, 2020]. Il est à noter qu'un certain nombre de facteurs impliqués dans la régulation de la structure chromatinienne (cohésines, remodeleurs chromatiniens) et la transcription (sous-unités du médiateur de la transcription) ont été retrouvés dans ce crible [Lebraud *et al.*, 2020], suggérant que le recrutement d'OGG1 est lié à l'état de la structure chromatinienne. Cette hypothèse serait cohérente avec le fait que le remodelage de la chromatine est nécessaire au BER en hétérochromatine mais pas en euchromatine [Lan *et al.*, 2014]. De plus, une association directe de certaines sous-unités du médiateur et des cohésines avec OGG1 spécifiquement en conditions oxydantes a été mise en évidence, suggérant que la dépendance du recrutement d'OGG1 à la présence de ces protéines ne soit pas uniquement dû à leur impact sur la structure chromatinienne mais à une implication directe de ces facteurs dans le BER [Lebraud *et al.*, 2020].

4. Excision et relargage d'OGG1 de la zone de dommages

La rétention prolongée d'OGG1 sur l'ADN en cas d'incapacité à exciser la 8-oxoG est connue depuis longtemps. En effet, c'est le mutant d'OGG1(K249Q), incapable de réaliser l'excision mais en mesure de reconnaître la lésion [van der Kemp *et al.*, 2004], qui a rendu possible la cristallisation du complexe ADN/OGG1 en prolongeant sa rétention sur la lésion, permettant ainsi d'élucider sa structure [Bruner *et al.*, 2000]. De précédents résultats du laboratoire ont également montré qu'en cas de stress chimique ce même mutant était retenu à la fraction chromatinienne pendant plusieurs heures [Amouroux *et al.*, 2010], et qu'après induction de 8-oxoG par micro-irradiation, l'enrichissement local était également prolongé par rapport au WT [Campalans *et al.*, 2013].

Durant ma thèse, j'ai pu retrouver des résultats similaires pour ce mutant en micro-irradiation (Figures P6C-E), mais également pour le mutant 2NA (Figures P6C-E), dont l'activité catalytique amoindrie a été confirmée par des tests d'activité *in vitro* [(Figures P5C). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur d'OGG1 bloquant uniquement l'excision (mais pas la reconnaissance) de la 8-oxoG produit également des résultats similaires (Figures P6F-G). L'ensemble de ces résultats tend donc à confirmer que l'excision de la 8-oxoG par OGG1 est nécessaire au relargage de cette dernière.

La question résultant de cette rétention prolongée à la zone de dommage concerne la dynamique de ces mutants : sont-ils stablement liés à la chromatine, ou à l'inverse, continuent-ils à échanger entre une population liée et une population libre malgré la sur-accumulation prolongée ? Afin de répondre à cette question, j'ai réalisé des expériences de FRAP à la zone de dommages,

permettant l'étude de la dynamique de ces mutants après induction de 8-oxoG (Figure SP4C). Nous pouvons voir que la fluorescence revient dans la zone photoblanchie au même niveau que dans toute la zone micro-irradiée, montrant ainsi qu'OGG1 n'est pas liée de façon stable au niveau des dommages, mais échange de manière rapide entre une population liée au dommage et une population diffusante.

III. Conclusion et perspectives

Mes travaux de thèse ont permis d'améliorer la compréhension que nous avons du fonctionnement et d'apporter de nouvelles connaissances à propos de la dynamique de recherche de la 8-oxoG par OGG1 en cellules vivantes. Les résultats obtenus en cellules sont très cohérents avec les précédentes données *in vitro*, et montrent que l'interaction entre OGG1 et l'ADN a un rôle majeur dans la dynamique de recherche de la 8-oxoG, malgré le fait que l'ADN ne soit pas nu mais sous forme de chromatine, la grande quantité de protéines liées dessus entravant potentiellement la route d'OGG1. Maintenant, il serait intéressant d'étudier cette dynamique grâce à des techniques de molécule unique alliées à de la super-résolution comme le SPT-PALM (microscopie par localisation photo-activée – *Photo-Activated Localization Microscopy*), afin de caractériser cette interaction entre OGG1 et l'ADN : quelle est la part de glissement 1D comparée au *hopping* ? Ce glissement 1D (si tant est qu'il existe en cellules) est-il rotationnel comme il a pu être montré *in vitro* ?

Par ailleurs, l'implication de nombreux résidus impliqués à différentes étapes allant de la phase de recherche de la 8-oxoG au relargage après excision de la lésion a été caractérisée. Ainsi, nous avons pu montrer que si la reconnaissance de la 8-oxoG n'était pas l'élément limitant de la dynamique de recherche, elle jouait par contre un rôle important dans le recrutement d'OGG1 à la zone micro-irradiée. Cette reconnaissance de la 8-oxoG n'est toutefois pas le seul facteur en jeu, et la reconnaissance de la cytosine, essentielle à la sélectivité d'OGG1 pour la paire 8-oxoG:C est elle aussi probablement impliquée dans le recrutement de l'ADN-glycosylase. De plus, la détection d'autres lésions (sites AP, FapyG) ou l'intervention de cofacteurs sont susceptibles de contribuer assez largement au recrutement d'OGG1. Il pourrait d'ailleurs être intéressant de bloquer l'accès aux sites AP, soit chimiquement, soit grâce à un inhibiteur d'APE1 qui piégerait cette enzyme dessus, pour voir comment cela impacterait le recrutement d'OGG1. D'une manière générale, il faudrait aussi étudier l'implication des FapyG dans le recrutement d'OGG1, qui est actuellement très mal caractérisée. Cette tâche est compliquée par l'absence d'anticorps spécifique ou de protéine reconnaissant exclusivement les FapyG. Toutefois, il est possible de mieux caractériser les capacités à

détecter et exciser les FapyG d'OGG1 et de ses mutants en gel retard et gel d'activité. Cela pourrait permettre d'identifier un mutant incapable de reconnaître les FapyG et donc d'étudier la part jouée par ces lésions dans les dynamiques de recherche et recrutement d'OGG1. Obtenir une structure du complexe OGG1/FapyG pourrait grandement aider à identifier les résidus d'intérêts.

Par la suite, il serait essentiel de caractériser *in vitro* les mutants Y203A, R154A, R204A et 2RA en terme d'activité enzymatique et de liaison à l'ADN, afin de pouvoir confirmer la perte de spécificité pour la cytosine et les hypothèses proposées ici. L'étude des deux doubles mutants restants du motif NNN (N149A/N151A et N150A/N151A) serait également extrêmement intéressante afin de mieux caractériser ce motif. En effet, les mutants simples et le triple mutant n'affectent pas la dynamique de recherche de la 8-oxoG, et seul le 3NA a un impact notable sur la cinétique de recrutement, alors que le 2NA a un impact marqué sur ces deux aspects. Qu'en est-il donc des mutants N149A/N151A et N150A/N151A ? Vont-ils avoir des effets similaires au 2NA, ou encore différents ? Si l'effet observé avec le 2NA est un effet spécifique au N151, les deux mutants N149A/N151A et N150A/N151A ne devraient pas avoir d'effet fort sur la dynamique d'OGG1. A l'inverse, si ces trois résidus s'équilibrent et se stabilisent entre eux, il est probable que les trois doubles mutants aient des effets similaires. Répondre à ces questions permettrait de mieux comprendre le rôle et le fonctionnement de ce motif, aussi mal caractérisé qu'il est conservé. Enfin, l'étude de mutants plus complexes associant différents domaines ou fonctions de la protéine (par exemple le motif NNN et Y203, R154 ou R204, ou R154 et/ou R204 et Y203) pourrait également être intéressante afin de mieux comprendre les interactions entre ces différents aspects du fonctionnement d'OGG1.

En conclusion, ces travaux ont permis d'apporter de nouvelles connaissances quant à la dynamique d'OGG1 en cellules, et sur le fonctionnement de plusieurs résidus clés de la protéine. De nombreuses questions persistent cependant sur les mécanismes sous-tendant la dynamique d'OGG1, et sur les rôles de plusieurs acides aminés ou domaines (comme le motif NNN). De même, l'implication de différents types de dommages et cofacteurs dans le recrutement d'OGG1 est loin d'être élucidée ; ce qui laisse de belles perspectives pour les années à venir.

Références Bibliographiques

- Abbe, E. 1881. « VII.—On the Estimation of Aperture in the Microscope. » *Journal of the Royal Microscopical Society* 1 (3): 388-423. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1881.tb05909.x>.
- Abbe, Ernst. 1874. *Neue Apparate zur Bestimmung des Brechungs- und Zerstreungsvermögens fester und flüssiger Körper*. Mauke's Verlag.
- Abbotts, Rachel, et David M. Wilson. 2017. « Coordination of DNA single strand break repair ». *Free Radical Biology and Medicine*, Oxidative DNA Damage & Repair, 107 (juin): 228-44. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039>.
- Abner, Clint W., Albert Y. Lau, Tom Ellenberger, et Linda B. Bloom. 2001. « Base Excision and DNA Binding Activities of Human Alkyladenine DNA Glycosylase Are Sensitive to the Base Paired with a Lesion ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (16): 13379-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010641200>.
- Abolhassani, Nona, Julio Leon, Zijing Sheng, Sugako Oka, Hideomi Hamasaki, Toru Iwaki, et Yusaku Nakabeppu. 2017. « Molecular Pathophysiology of Impaired Glucose Metabolism, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative DNA Damage in Alzheimer's Disease Brain ». *Mechanisms of Ageing and Development*, SI:CNS DNA damage, 161 (janvier): 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.05.005>.
- « Acuité visuelle ». s. d. SNOF. Consulté le 7 septembre 2022. <https://www.snof.org/encyclopedie/acuit%C3%A9-visuelle>.
- Adkins, Nicholas L, Meagan Watts, et Philippe T Georgel. 2004. « To the 30-Nm Chromatin Fiber and Beyond ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, Chromatin structure and function, 1677 (1): 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.09.013>.
- Alberty, Robert A., et Gordon G. Hammes. 1958. « Application of the Theory of Diffusion-controlled Reactions to Enzyme Kinetics ». *The Journal of Physical Chemistry* 62 (2): 154-59. <https://doi.org/10.1021/j150560a005>.
- Alexandrov, Ludmil B., Serena Nik-Zainal, David C. Wedge, Samuel A. J. R. Aparicio, Sam Behjati, Andrew V. Biankin, Graham R. Bignell, et al. 2013. « Signatures of Mutational Processes in Human Cancer ». *Nature* 500 (7463): 415-21. <https://doi.org/10.1038/nature12477>.
- Amouroux, R., A. Campalans, B. Epe, et J. P. Radicella. 2010. « Oxidative Stress Triggers the Preferential Assembly of Base Excision Repair Complexes on Open Chromatin Regions., Oxidative Stress Triggers the Preferential Assembly of Base Excision Repair Complexes on Open Chromatin Regions ». *Nucleic Acids Research*, *Nucleic Acids Research* 38, 38 (9, 9): 2878, 2878-90. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1247>, [10.1093/nar/gkp1247](https://doi.org/10.1093/nar/gkp1247).
- « Anatomy of an Electromagnetic Wave | Science Mission Directorate ». s. d. Consulté le 7 septembre 2022. https://science.nasa.gov/ems/02_anatomy.
- « Anatomy of the Microscope - Mechanical Tube Length | Olympus LS ». s. d. Consulté le 6 octobre 2022. <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/tubelength/>.

- Aragon, Luis, Enrique Martinez-Perez, et Matthias Merckenschlager. 2013. « Condensin, cohesin and the control of chromatin states ». *Current Opinion in Genetics & Development*, Genome architecture and expression, 23 (2): 204-11. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.11.004>.
- Audebert, M., J. P. Radicella, et M. Dizdaroglu. 2000. « Effect of Single Mutations in the OGG1 Gene Found in Human Tumors on the Substrate Specificity of the Ogg1 Protein ». *Nucleic Acids Research* 28 (14): 2672-78. <https://doi.org/10.1093/nar/28.14.2672>.
- Audebert, Marc, J Baptiste Charbonnier, Serge Boiteux, et J Pablo Radicella. 2002. « Mitochondrial Targeting of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase HOGG1 Is Impaired by a Somatic Mutation Found in Kidney Cancer ». *DNA Repair* 1 (7): 497-505. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(02\)00034-4](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(02)00034-4).
- Ayala-Peña, Sylvette. 2013. « Role of Oxidative DNA Damage in Mitochondrial Dysfunction and Huntington's Disease Pathogenesis ». *Free radical biology & medicine* 62 (septembre): 102-10. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.017>.
- Ba, Xueqing, Leopoldo Aguilera-Aguirre, Qura Tul Ain Nmi Rashid, Attila Bacsi, Zsolt Radak, Sanjiv Sur, Koa Hosoki, Muralidhar L. Hegde, et Istvan Boldogh. 2014. « The Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 in Inflammation ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (9): 16975-97. <https://doi.org/10.3390/ijms150916975>.
- Ba, Xueqing, Attila Bacsi, Jixian Luo, Leopoldo Aguilera-Aguirre, Xianlu Zeng, Zsolt Radak, Allan R. Brasier, et Istvan Boldogh. 2014. « 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 Augments Proinflammatory Gene Expression by Facilitating the Recruitment of Site-Specific Transcription Factors ». *The Journal of Immunology* 192 (5): 2384-94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302472>.
- Ba, Xueqing, et Istvan Boldogh. 2018. « 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions ». *Redox Biology* 14 (avril): 669-78. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.008>.
- Ballmaier, Daniel, et Bernd Epe. 1995. « Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells ». *Carcinogenesis* 16 (2): 335-42. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.2.335>.
- Bancaud, Aurélien, Sébastien Huet, Nathalie Daigle, Julien Mozziconacci, Joël Beaudouin, et Jan Ellenberg. 2009. « Molecular Crowding Affects Diffusion and Binding of Nuclear Proteins in Heterochromatin and Reveals the Fractal Organization of Chromatin ». *The EMBO Journal* 28 (24): 3785-98. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.340>.
- Bandaru, Viswanath, Sirisha Sunkara, Susan S Wallace, et Jeffrey P Bond. 2002. « A Novel Human DNA Glycosylase That Removes Oxidative DNA Damage and Is Homologous to Escherichia Coli Endonuclease VIII ». *DNA Repair* 1 (7): 517-29. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00036-8).
- Banerjee, Anirban, Webster L. Santos, et Gregory L. Verdine. 2006. « Structure of a DNA Glycosylase Searching for Lesions ». *Science (New York, N.Y.)* 311 (5764): 1153-57. <https://doi.org/10.1126/science.1120288>.
- Banerjee, Anirban, Wei Yang, Martin Karplus, et Gregory L. Verdine. 2005. « Structure of a Repair Enzyme Interrogating Undamaged DNA Elucidates Recognition of Damaged DNA ». *Nature* 434 (7033): 612-18. <https://doi.org/10.1038/nature03458>.

- Bardell, David. 2004. « The Biologists' Forum: The invention of the microscope ». *BIOS* 75 (2): 78-84. [https://doi.org/10.1893/0005-3155\(2004\)75<78:TIOTM>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1893/0005-3155(2004)75<78:TIOTM>2.0.CO;2).
- Barnes, Ryan P., Mariarosaria de Rosa, Sanjana A. Thosar, Ariana C. Detwiler, Vera Roginskaya, Bennett Van Houten, Marcel P. Bruchez, Jacob Stewart-Ornstein, et Patricia L. Opresko. 2022. « Telomeric 8-Oxo-Guanine Drives Rapid Premature Senescence in the Absence of Telomere Shortening ». *Nature Structural & Molecular Biology* 29 (7): 639-52. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00790-y>.
- Bartoszewski, Rafal A., Michael Jablonsky, Sylwia Bartoszezwska, Lauren Stevenson, Qun Dai, John Kappes, James F. Collawn, et Zsuzsa Bebok. 2010. « A Synonymous Single Nucleotide Polymorphism in Δ F508 CFTR Alters the Secondary Structure of the mRNA and the Expression of the Mutant Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (37): 28741-48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154575>.
- Basu, Ashis K. 2018. « DNA Damage, Mutagenesis and Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4): E970. <https://doi.org/10.3390/ijms19040970>.
- Beaudouin, Joël, Felipe Mora-Bermúdez, Thorsten Klee, Nathalie Daigle, et Jan Ellenberg. 2006. « Dissecting the Contribution of Diffusion and Interactions to the Mobility of Nuclear Proteins ». *Biophysical Journal* 90 (6): 1878-94. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071241>.
- Beecher, Maria, Namrata Kumar, Sunbok Jang, Vesna Rapić-Otrin, et Bennett Van Houten. 2020. « Expanding molecular roles of UV-DDB: shining light on genome stability and cancer ». *DNA repair* 94 (octobre): 102860. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102860>.
- Beishline, Kate, et Jane Azizkhan-Clifford. 2014. « Interplay between the Cell Cycle and Double-Strand Break Response in Mammalian Cells ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1170: 41-59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_3.
- Bekker-Jensen, Simon, Claudia Lukas, Risa Kitagawa, Fredrik Melander, Michael B. Kastan, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 2006. « Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks ». *The Journal of Cell Biology* 173 (2): 195-206. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510130>.
- Bekker-Jensen, Simon, et Niels Mailand. 2010. « Assembly and Function of DNA Double-Strand Break Repair Foci in Mammalian Cells ». *DNA Repair, A break is not the End; insight into the damage response to DNA double strand A break is not the End; insight into the damage response to DNA double strand breaks*, 9 (12): 1219-28. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.09.010>.
- Belintsev, B N, S K Zavriev, et M F Shemyakin. 1980. « On the promoter complex formation rate of E. coli RNA polymerases with T7 phage DNA. ». *Nucleic Acids Research* 8 (6): 1391-1404.
- Bellanger, Eric, Xavier Ducros, Jérôme Perez, Vincent Renvoizé, et Michel Roy. 2013. *Physique MPSI-PCSI-PTSI: Programme 2013*. Pearson Education France.
- Berg, Otto G., Robert B. Winter, et Peter H. Von Hippel. 1981. « Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory ». *Biochemistry* 20 (24): 6929-48. <https://doi.org/10.1021/bi00527a028>.
- Berquist, Brian R., Dharmendra Kumar Singh, Jinshui Fan, Daemyung Kim, Elizabeth Gillenwater, Avanti Kulkarni, Vilhelm A. Bohr, Eric J. Ackerman, Alan E. Tomkinson, et David M. Wilson. 2010. « Functional capacity of XRCC1 protein variants identified in DNA repair-

- deficient Chinese hamster ovary cell lines and the human population ». *Nucleic Acids Research* 38 (15): 5023-35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq193>.
- Bertram, J. S. 2000. « The Molecular Biology of Cancer ». *Molecular Aspects of Medicine* 21 (6): 167-223. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(00)00007-8).
- Birben, Esra, Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum, et Omer Kalayci. 2012. « Oxidative Stress and Antioxidant Defense ». *The World Allergy Organization Journal* 5 (1): 9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
- Biterge, Burcu, et Robert Schneider. 2014. « Histone Variants: Key Players of Chromatin ». *Cell and Tissue Research* 356 (3): 457-66. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1862-4>.
- Bjorås, M., L. Luna, B. Johnsen, E. Hoff, T. Haug, T. Rognes, et E. Seeberg. 1997. « Opposite Base-Dependent Reactions of a Human Base Excision Repair Enzyme on DNA Containing 7,8-Dihydro-8-Oxoguanine and Abasic Sites ». *The EMBO Journal* 16 (20): 6314-22. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.20.6314>.
- Blainey, Paul C, Guobin Luo, S C Kou, Walter F Mangel, Gregory L Verdine, Biman Bagchi, et X Sunney Xie. 2009. « Nonspecifically bound proteins spin while diffusing along DNA ». *Nature structural & molecular biology* 16 (12): 1224-29. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1716>.
- Blainey, Paul C., Antoine M. van Oijen, Anirban Banerjee, Gregory L. Verdine, et X. Sunney Xie. 2006. « A Base-Excision DNA-Repair Protein Finds Intrahelical Lesion Bases by Fast Sliding in Contact with DNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (15): 5752-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509723103>.
- Boiteux, Serge, Franck Coste, et Bertrand Castaing. 2017. « Repair of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanine in Prokaryotic and Eukaryotic Cells: Properties and Biological Roles of the Fpg and OGG1 DNA N-Glycosylases ». *Free Radical Biology and Medicine, Oxidative DNA Damage & Repair*, 107 (juin): 179-201. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.042>.
- Boiteux, Serge, et J. Pablo Radicella. 2000. « The Human OGG1 Gene: Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 377 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1773>.
- Bonnet, Isabelle, Andreas Biebricher, Pierre-Louis Porté, Claude Loverdo, Olivier Bénichou, Raphaël Voituriez, Christophe Escudé, Wolfgang Wende, Alfred Pingoud, et Pierre Desbiolles. 2008. « Sliding and jumping of single EcoRV restriction enzymes on non-cognate DNA ». *Nucleic Acids Research* 36 (12): 4118-27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn376>.
- Boorstein, Robert J., Archie Cummings, Dina R. Marenstein, Michael K. Chan, Yuliang Ma, Thomas A. Neubert, Stuart M. Brown, et George W. Teebor. 2001. « Definitive Identification of Mammalian 5-Hydroxymethyluracil DNAN-Glycosylase Activity as SMUG1 ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 41991-97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106953200>.
- Boujard, Daniel, Bruno Anselme, Christophe Cullin, et Céline Raguene-Nicol. 2012. *Biologie cellulaire et moléculaire -Tout le cours en fiches (+ site compagnon): 200 fiches de cours, 160 QCM et bonus web*. Paris: Dunod.
- Braeckmans, Kevin, Kevin Buyens, Broes Naeye, Dries Vercauteren, Hendrik Deschout, Koen Raemdonck, Katrien Remaut, Niek N. Sanders, Jo Demeester, et Stefaan C. De Smedt. 2010. « Advanced Fluorescence Microscopy Methods Illuminate the Transfection Pathway of

- Nucleic Acid Nanoparticles ». *Journal of Controlled Release*, 11th European Symposium on Controlled Drug Delivery, 148 (1): 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.029>.
- Bravard, Anne, Monique Vacher, Eva Moritz, Laurence Vaslin, Janet Hall, Bernd Epe, et J. Pablo Radicella. 2009. « Oxidation Status of Human OGG1-S326C Polymorphic Variant Determines Cellular DNA Repair Capacity ». *Cancer Research* 69 (8): 3642-49. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3943>.
- Briand, Nolwenn, et Philippe Collas. 2020. « Lamina-associated domains: peripheral matters and internal affairs ». *Genome Biology* 21 (avril): 85. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02003-5>.
- Brown, Robert. 1828. « XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies ». *The Philosophical Magazine* 4 (21): 161-73. <https://doi.org/10.1080/14786442808674769>.
- Bruner, S. D., D. P. Norman, J. C. Fromme, et G. L. Verdine. 2000. « Structural and Mechanistic Studies on Repair of 8-Oxoguanine in Mammalian Cells ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 65: 103-11. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.103>.
- Budworth, Helen, Faye R. Harris, Paul Williams, Do Yup Lee, Amy Holt, Jens Pahnke, Bartosz Szczesny, Karina Acevedo-Torres, Sylvette Ayala-Peña, et Cynthia T. McMurray. 2015. « Suppression of Somatic Expansion Delays the Onset of Pathophysiology in a Mouse Model of Huntington's Disease ». *PLOS Genetics* 11 (8): e1005267. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005267>.
- Bukowska, Barbara, et Bolesław T. Karwowski. 2018. « Actual State of Knowledge in the Field of Diseases Related with Defective Nucleotide Excision Repair ». *Life Sciences* 195 (février): 6-18. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.035>.
- Bulina, Maria E., Dmitriy M. Chudakov, Olga V. Britanova, Yurii G. Yanushevich, Dmitry B. Staroverov, Tatyana V. Chepurnykh, Ekaterina M. Merzlyak, Maria A. Shkrob, Sergey Lukyanov, et Konstantin A. Lukyanov. 2006. « A Genetically Encoded Photosensitizer ». *Nature Biotechnology* 24 (1): 95-99. <https://doi.org/10.1038/nbt1175>.
- Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, et D. J. Chen. 2001. « ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-Strand Breaks ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 42462-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>.
- Caldecott, Keith W. 2008. « Single-Strand Break Repair and Genetic Disease ». *Nature Reviews. Genetics* 9 (8): 619-31. <https://doi.org/10.1038/nrg2380>.
- . 2014. « DNA single-strand break repair ». *Experimental Cell Research, DNA DAMAGE AND REPAIR*, 329 (1): 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.027>.
- Calil, Felipe A., Bin-Zhong Li, Kendall A. Torres, Katarina Nguyen, Nikki Bowen, Christopher D. Putnam, et Richard D. Kolodner. 2021. « Rad27 and Exo1 Function in Different Excision Pathways for Mismatch Repair in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Nature Communications* 12 (1): 5568. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25866-z>.
- Callens, Martijn, Léa Pradier, Michael Finnegan, Caroline Rose, et Stéphanie Bedhomme. 2021. « Read between the Lines: Diversity of Nontranslational Selection Pressures on Local Codon

Usage ». *Genome Biology and Evolution* 13 (9): evab097.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evab097>.

- Campalans, Anna, Rachel Amouroux, Anne Bravard, Bernd Epe, et J. Pablo Radicella. 2007. « UVA Irradiation Induces Relocalisation of the DNA Repair Protein HOGG1 to Nuclear Speckles ». *Journal of Cell Science* 120 (Pt 1): 23-32. <https://doi.org/10.1242/jcs.03312>.
- Campalans, Anna, Thierry Kortulewski, Rachel Amouroux, Hervé Menoni, Wim Vermeulen, et J. Pablo Radicella. 2013. « Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair ». *Nucleic Acids Research* 41 (5): 3115-29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt025>.
- Campalans, Anna, et J. Radicella. 2016. « Laser Microirradiation and Temporal Analysis of XRCC1 Recruitment to Single-Strand DNA Breaks ». *BIO-PROTOCOL* 6 (5). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1746>.
- Campisi, Judith, Pankaj Kapahi, Gordon J. Lithgow, Simon Melov, John C. Newman, et Eric Verdin. 2019. « From Discoveries in Ageing Research to Therapeutics for Healthy Ageing ». *Nature* 571 (7764): 183-92. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1365-2>.
- Cannan, Wendy J., et David S. Pederson. 2016. « Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin ». *Journal of cellular physiology* 231 (1): 3-14. <https://doi.org/10.1002/jcp.25048>.
- Capranico, Giovanni, Jessica Marinello, et Giovanni Chillemi. 2017. « Type I DNA Topoisomerases ». *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (6): 2169-92. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00966>.
- Caron, Gersende, Mourad Hussein, Marta Kulis, Céline Delaloy, Fabrice Chatonnet, Amandine Pignarre, Stéphane Avner, et al. 2015. « Cell-Cycle-Dependent Reconfiguration of the DNA Methylome during Terminal Differentiation of Human B Cells into Plasma Cells ». *Cell Reports* 13 (5): 1059-71. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.051>.
- Carusillo, Antonio, et Claudio Mussolino. 2020. « DNA Damage: From Threat to Treatment ». *Cells* 9 (7): E1665. <https://doi.org/10.3390/cells9071665>.
- Cassidy, David C., Gerald Holton, F. James Rutherford, et Harvard Project Physics. 2002. *Understanding Physics*. Springer Science & Business Media.
- Castaing, B, A Geiger, H Seliger, P Nehls, J Laval, C Zelwer, et S Boiteux. 1993. « Cleavage and binding of a DNA fragment containing a single 8-oxoguanine by wild type and mutant FPG proteins. » *Nucleic Acids Research* 21 (12): 2899-2905.
- Chakravarti, D., G. C. Ibeanu, K. Tano, et S. Mitra. 1991. « Cloning and Expression in Escherichia Coli of a Human cDNA Encoding the DNA Repair Protein N-Methylpurine-DNA Glycosylase ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (24): 15710-15.
- Chang, Yun-Pei, Fabien Pinaud, Joshua Antelman, et Shimon Weiss. 2008. « Tracking bio-molecules in live cells using quantum dots ». *Journal of biophotonics* 1 (4): 287-98. <https://doi.org/10.1002/jbio.200810029>.
- Chetsanga, C. J., et T. Lindahl. 1979. « Release of 7-Methylguanine Residues Whose Imidazole Rings Have Been Opened from Damaged DNA by a DNA Glycosylase from Escherichia Coli ». *Nucleic Acids Research* 6 (11): 3673-84. <https://doi.org/10.1093/nar/6.11.3673>.

- Chiou, Yi-Ying, Jinchuan Hu, Aziz Sancar, et Christopher P. Selby. 2018. « RNA Polymerase II Is Released from the DNA Template during Transcription-Coupled Repair in Mammalian Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (7): 2476-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000971>.
- Chung, M. H., H. Kasai, D. S. Jones, H. Inoue, H. Ishikawa, E. Ohtsuka, et S. Nishimura. 1991. « An Endonuclease Activity of Escherichia Coli That Specifically Removes 8-Hydroxyguanine Residues from DNA ». *Mutation Research/DNA Repair* 254 (1): 1-12. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(91\)90035-N](https://doi.org/10.1016/0921-8777(91)90035-N).
- Cognet, Laurent, Brahim Lounis, et Daniel Choquet. 2014. « Tracking Receptors Using Individual Fluorescent and Nonfluorescent Nanolabels ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2014 (2): 207-13. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot080416>.
- Cogoi, Susanna, Annalisa Ferino, Giulia Miglietta, Erik B Pedersen, et Luigi E Xodo. 2018. « The regulatory G4 motif of the Kirsten ras (KRAS) gene is sensitive to guanine oxidation: implications on transcription ». *Nucleic Acids Research* 46 (2): 661-76. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1142>.
- Conant, Gavin C., et Peter F. Stadler. 2009. « Solvent Exposure Imparts Similar Selective Pressures across a Range of Yeast Proteins ». *Molecular Biology and Evolution* 26 (5): 1155-61. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp031>.
- Corliss, J. O. 1975. « Three Centuries of Protozoology: A Brief Tribute to Its Founding Father, A. van Leeuwenhoek of Delft ». *The Journal of Protozoology* 22 (1): 3-7.
- Cortez, David. 2019. « Replication-coupled DNA Repair ». *Molecular cell* 74 (5): 866-76. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.027>.
- Cravens, S.L., Hobson, M., Stivers, J.T., 2014. Electrostatic Properties of Complexes along a DNA Glycosylase Damage Search Pathway. *Biochemistry* 53, 7680-7692. <https://doi.org/10.1021/bi501011m>
- Cravens, Shannen L., et James T. Stivers. 2016. « Comparative Effects of Ions, Molecular Crowding, and Bulk DNA on the Damage Search Mechanisms of hOGG1 and hUNG ». *Biochemistry* 55 (37): 5230-42. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00482>.
- Crosby, B., L. Prakash, H. Davis, et D. C. Hinkle. 1981. « Purification and Characterization of a Uracil-DNA Glycosylase from the Yeast, *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Nucleic Acids Research* 9 (21): 5797-5809. <https://doi.org/10.1093/nar/9.21.5797>.
- Cutter, Amber, et Jeffrey J. Hayes. 2015. « A Brief Review of Nucleosome Structure ». *FEBS letters* 589 (20 0 0): 2914-22. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016>.
- Dalhus, Bjørn, Monika Forsbring, Ina Høydal Helle, Erik Sebastian Vik, Rune Johansen Forstrøm, Paul Hoff Backe, Ingun Alseth, et Magnar Bjørås. 2011. « Separation-of-Function Mutants Unravel the Dual-Reaction Mode of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase ». *Structure* 19 (1): 117-27. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.09.023>.
- Das, Aditi, Lee Wiederhold, John B. Leppard, Padmini Kedar, Rajendra Prasad, Huxian Wang, Istvan Boldogh, et al. 2006. « NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: Evidence for a repair complex in human cells ». *DNA repair* 5 (12): 1439-48. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.07.003>.

- D'Augustin, Ostiane, Sébastien Huet, Anna Campalans, et Juan Pablo Radicella. 2020. « Lost in the Crowd: How Does Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1 (OGG1) Find 8-Oxoguanine in the Genome? » *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): E8360. <https://doi.org/10.3390/ijms21218360>.
- Dehghani, Hesam, Graham Dellaire, et David P. Bazett-Jones. 2005. « Organization of Chromatin in the Interphase Mammalian Cell ». *Micron* 36 (2): 95-108. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2004.10.003>.
- Denver, Dee R., Stephanie L. Swenson, et Michael Lynch. 2003. « An Evolutionary Analysis of the Helix-Hairpin-Helix Superfamily of DNA Repair Glycosylases ». *Molecular Biology and Evolution* 20 (10): 1603-11. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg177>.
- D'Errico, Mariarosaria, Eleonora Parlanti, Massimo Teson, Bruno M Bernardes de Jesus, Paolo Degan, Angelo Calcagnile, Pawel Jaruga, et al. 2006. « New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage ». *The EMBO Journal* 25 (18): 4305-15. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601277>.
- Dherin, C, J P Radicella, M Dizdaroglu, et S Boiteux. 1999. « Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. » *Nucleic Acids Research* 27 (20): 4001-7.
- Dosanjh, M. K., R. Roy, S. Mitra, et B. Singer. 1994. « 1,N6-Ethenoadenine Is Preferred over 3-Methyladenine as Substrate by a Cloned Human N-Methylpurine-DNA Glycosylase (3-Methyladenine-DNA Glycosylase) ». *Biochemistry* 33 (7): 1624-28. <https://doi.org/10.1021/bi00173a002>.
- Dou, Hong, Sankar Mitra, et Tapas K. Hazra. 2003. « Repair of Oxidized Bases in DNA Bubble Structures by Human DNA Glycosylases NEIL1 and NEIL2 ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (50): 49679-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308658200>.
- Drexler, Guido A., et Miguel J. Ruiz-Gómez. 2015. « Microirradiation Techniques in Radiobiological Research ». *Journal of Biosciences* 40 (3): 629-43. <https://doi.org/10.1007/s12038-015-9535-3>.
- D'Souza, Areetha, Alexandra M. Blee, et Walter J. Chazin. 2022. « Mechanism of Action of Nucleotide Excision Repair Machinery ». *Biochemical Society Transactions* 50 (1): 375-86. <https://doi.org/10.1042/BST20210246>.
- Dunn, Andrew R., Neil M. Kad, Shane R. Nelson, David M. Warshaw, et Susan S. Wallace. 2011. « Single Qdot-labeled glycosylase molecules use a wedge amino acid to probe for lesions while scanning along DNA ». *Nucleic Acids Research* 39 (17): 7487-98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr459>.
- Einstein, Albert. 1905. « Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen ». -, Einstein, Albert: Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, -: - -. 1905. https://dlc.mpg.de/image/867311991/2/LOG_0000/.
- Elahi, Abul, Zhong Zheng, Jong Park, Kathy Eyring, Thomas McCaffrey, et Philip Lazarus. 2002. « The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk ». *Carcinogenesis* 23 (7): 1229-34. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.7.1229>.

- Elf, Johan, Gene-Wei Li, et X. Sunney Xie. 2007. « Probing Transcription Factor Dynamics at the Single-Molecule Level in a Living Cell ». *Science* 316 (5828): 1191-94. <https://doi.org/10.1126/science.1141967>.
- Erie, Dorothy A., et Keith R. Weninger. 2014. « Single Molecule Studies of DNA Mismatch Repair ». *DNA Repair* 20 (août): 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.007>.
- Esadze, Alexandre, et James T. Stivers. 2018. « Facilitated Diffusion Mechanisms in DNA Base Excision Repair and Transcriptional Activation ». *Chemical Reviews* 118 (23): 11 298-323. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00513>.
- Etourneau, Laure, Angela Moussa, Emilie Rass, Diane Genet, Simon Willaume, Caroline Chabance-Okumura, Paul Wanschoor, et al. 2021. « Lamin B1 sequesters 53BP1 to control its recruitment to DNA damage ». *Science Advances* 7 (35): eabb3799. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb3799>.
- Fenton, H. J. H. 1894. « LXXIII.—Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron ». *Journal of the Chemical Society, Transactions* 65 (0): 899-910. <https://doi.org/10.1039/CT8946500899>.
- Fick, Adolf. 1855. « Ueber Diffusion ». *Annalen Der Physik* 170 (1): 59-86. <https://doi.org/10.1002/andp.18551700105>.
- Fijen, Carel, et Eli Rothenberg. 2021. « The evolving complexity of DNA damage foci: RNA, condensates and chromatin in DNA double-strand break repair ». *DNA repair* 105 (septembre): 103 170. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103170>.
- Fleming, Aaron M, et Cynthia J Burrows. 2021. « Oxidative stress-mediated epigenetic regulation by G-quadruplexes ». *NAR Cancer* 3 (3): zcab038. <https://doi.org/10.1093/narcan/zcab038>.
- Fleming, Aaron M., Yun Ding, et Cynthia J. Burrows. 2017. « Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (10): 2604-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619809114>.
- Fortini, Paola, et Eugenia Dogliotti. 2007. « Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways ». *DNA Repair, Repair of small base lesions in DNA—from molecular biology to phenotype*, 6 (4): 398-409. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.008>.
- Fortini, Paola, Eleonora Parlanti, Olga M. Sidorkina, Jacques Laval, et Eugenia Dogliotti. 1999. « The Type of DNA Glycosylase Determines the Base Excision Repair Pathway in Mammalian Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (21): 15 230-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.15230>.
- Fouquerel, Elise, Ryan P. Barnes, Shikhar Uttam, Simon C. Watkins, Marcel P. Bruchez, et Patricia L. Opresko. 2019. « Targeted and Persistent 8-Oxoguanine Base Damage at Telomeres Promotes Telomere Loss and Crisis ». *Molecular Cell* 75 (1): 117-130.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.024>.
- Fraser, James, Iain Williamson, Wendy A. Bickmore, et Josée Dostie. 2015. « An Overview of Genome Organization and How We Got There: from FISH to Hi-C ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 79 (3): 347-72. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-15>.
- Fritz, Andrew J., Nitasha Sehgal, Artem Pliss, Jinhui Xu, et Ronald Berezney. 2019. « Chromosome territories and the global regulation of the genome ». *Genes, chromosomes & cancer* 58 (7): 407-26. <https://doi.org/10.1002/gcc.22732>.

- Gassman, Natalie R., et Samuel H. Wilson. 2015. « Micro-irradiation tools to visualize base excision repair and single-strand break repair ». *DNA Repair* 31 (juillet): 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.05.001>.
- Gazdar, AF. 2009. « Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer : role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors ». *Oncogene* 28 (Suppl 1): S24-31. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.198>.
- Gedik, Catherine M., Andrew Collins, et ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). 2005. « Establishing the Background Level of Base Oxidation in Human Lymphocyte DNA: Results of an Interlaboratory Validation Study ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (1): 82-84. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1767fje>.
- « Génétique, 8e éd. - William Klug, Michael Cummings - 9 782 744 071 522 - Biology - Cell/Molecular Biology (102) ». s. d. Consulté le 2 septembre 2022. <https://www.pearson.ch/HigherEducation/PearsonFrance/EAN/9782744071522/Genetique-8e-ed>.
- Godschalk, Roger W. L., Clara Ersson, Patrizia Riso, Marisa Porrini, Sabine A. S. Langie, Frederik-Jan van Schooten, Amaya Azqueta, et al. 2013. « DNA-Repair Measurements by Use of the Modified Comet Assay: An Inter-Laboratory Comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG) ». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 757 (1): 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.06.020>.
- Goedert, Michel. 2015. « Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein ». *Science* 349 (6248): 1255-555. <https://doi.org/10.1126/science.1255555>.
- Gottschalk, Aaron J., Gyula Timinszky, Stephanie E. Kong, Jingji Jin, Yong Cai, Selene K. Swanson, Michael P. Washburn, et al. 2009. « Poly(ADP-Ribosyl)ation Directs Recruitment and Activation of an ATP-Dependent Chromatin Remodeler ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (33): 13770-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906920106>.
- Goula, Agathi-Vasiliki, Christopher E. Pearson, Julie Della Maria, Yvon Trottier, Alan E. Tomkinson, David M. Wilson, et Karine Merienne. 2012. « The Nucleotide Sequence, DNA Damage Location, and Protein Stoichiometry Influence the Base Excision Repair Outcome at CAG/CTG Repeats ». *Biochemistry* 51 (18): 3919-32. <https://doi.org/10.1021/bi300410d>.
- Goula, Agathi-Vassiliki, Brian R. Berquist, David M. Wilson Iii, Vanessa C. Wheeler, Yvon Trottier, et Karine Merienne. 2009. « Stoichiometry of Base Excision Repair Proteins Correlates with Increased Somatic CAG Instability in Striatum over Cerebellum in Huntington's Disease Transgenic Mice ». *PLOS Genetics* 5 (12): e1000749. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000749>.
- Greenberg, Marc M. 2012. « The Formamidopyrimidines: Purine Lesions Formed in Competition With 8-Oxopurines From Oxidative Stress ». *Accounts of Chemical Research* 45 (4): 588-97. <https://doi.org/10.1021/ar2002182>.
- Guo, Lin, Jia Yi Har, Jagadish Sankaran, Yimian Hong, Balakrishnan Kannan, et Thorsten Wohland. 2008. « Molecular Diffusion Measurement in Lipid Bilayers over Wide Concentration Ranges: A Comparative Study ». *ChemPhysChem* 9 (5): 721-28. <https://doi.org/10.1002/cphc.200700611>.

- Gutteridge, John M. C. 1994. « Biological Origin of Free Radicals, and Mechanisms of Antioxidant Protection ». *Chemico-Biological Interactions*, Special Issue: The place of oxygen free radicals in HIV infections, 91 (2): 133-40. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0009-2797(94)90033-7).
- Hailer-Morrison, M. Katie, J. Michelle Kotler, Brooke D. Martin, et Kent D. Sugden. 2003. « Oxidized Guanine Lesions as Modulators of Gene Transcription. Altered p50 Binding Affinity and Repair Shielding by 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine Lesions in the NF- κ B Promoter Element ». *Biochemistry* 42 (32): 9761-70. <https://doi.org/10.1021/bi034546k>.
- Hall, Daniel B., R. Erik Holmlin, et Jacqueline K. Barton. 1996. « Oxidative DNA Damage through Long-Range Electron Transfer ». *Nature* 382 (6593): 731-35. <https://doi.org/10.1038/382731a0>.
- Hamilton, I., Gebala, M., Herschlag, D., Russell, R., 2022. Direct Measurement of Interhelical DNA Repulsion and Attraction by Quantitative Cross-Linking. *J Am Chem Soc* 144, 1718–1728. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c11122>
- Hannon, R, E G Richards, et H J Gould. 1986. « Facilitated diffusion of a DNA binding protein on chromatin. » *The EMBO Journal* 5 (12): 3313-19.
- Harrison, Peter T., Simon Vyse, et Paul H. Huang. 2020. « Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer ». *Seminars in Cancer Biology* 61 (avril): 167-79. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.015>.
- Hashiguchi, K., J. A. Stuart, N. C. de Souza-Pinto, et V. A. Bohr. 2004. « The C-terminal α O helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial β -Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity ». *Nucleic Acids Research* 32 (18): 5596-5608. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh863>.
- Haushalter, Karl A., P. Todd Stukenberg, Marc W. Kirschner, et Gregory L. Verdine. 1999. « Identification of a New Uracil-DNA Glycosylase Family by Expression Cloning Using Synthetic Inhibitors ». *Current Biology* 9 (4): 174-85. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80087-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80087-6).
- Hazra, Tapas K., Tadahide Izumi, Istvan Boldogh, Barry Imhoff, Yoke W. Kow, Pawel Jaruga, Miral Dizdaroglu, et Sankar Mitra. 2002. « Identification and Characterization of a Human DNA Glycosylase for Repair of Modified Bases in Oxidatively Damaged DNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (6): 3523-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.062053799>.
- Hazra, Tapas K., Yoke W. Kow, Zafar Hatahet, Barry Imhoff, Istvan Boldogh, Sanath K. Mokkaapati, Sankar Mitra, et Tadahide Izumi. 2002. « Identification and Characterization of a Novel Human DNA Glycosylase for Repair of Cytosine-Derived Lesions ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (34): 30417-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200355200>.
- Hazra, Tapas K., et Sankar Mitra. 2006. « Purification and Characterization of NEIL1 and NEIL2, Members of a Distinct Family of Mammalian DNA Glycosylases for Repair of Oxidized Bases ». In *Methods in Enzymology*, 408:33-48. DNA Repair, Part A. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)08003-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)08003-7).
- He, Jianjun, Yi Wang, Maria A. Missinato, Ezenwa Onuoha, Lydia A. Perkins, Simon C. Watkins, Claudette M. St Croix, Michael Tsang, et Marcel P. Bruchez. 2016. « A Genetically Targetable Near-Infrared Photosensitizer ». *Nature Methods* 13 (3): 263-68. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3735>.

- Hendrich, Brian, et Adrian Bird. 1998. « Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (11): 6538-47.
- Hendrich, Brian, Ulrike Hardeland, Huck-Hui Ng, Josef Jiricny, et Adrian Bird. 1999. « The Thymine Glycosylase MBD4 Can Bind to the Product of Deamination at Methylated CpG Sites ». *Nature* 401 (6750): 301-4. <https://doi.org/10.1038/45843>.
- Hernandez-Segura, Alejandra, Jamil Nehme, et Marco Demaria. 2018. « Hallmarks of Cellular Senescence ». *Trends in Cell Biology* 28 (6): 436-53. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>.
- Heuvel, Diana van den, Yana van der Weegen, Daphne E. C. Boer, Tomoo Ogi, et Martijn S. Luijsterburg. 2021. « Transcription-Coupled DNA Repair: From Mechanism to Human Disorder ». *Trends in Cell Biology* 31 (5): 359-71. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.02.007>.
- Hilbert, Timothy P., Wenren Chaung, Robert J. Boorstein, Richard P. Cunningham, et George W. Teebor. 1997. « Cloning and Expression of the cDNA Encoding the Human Homologue of the DNA Repair Enzyme, Escherichia Coli Endonuclease III ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (10): 6733-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6733>.
- Hill, Jeff W., et Michele K. Evans. 2006. « Dimerization and Opposite Base-Dependent Catalytic Impairment of Polymorphic S326C OGG1 Glycosylase ». *Nucleic Acids Research* 34 (5): 1620-32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl060>.
- Hill, Jeff W., Tapas K. Hazra, Tadahide Izumi, et Sankar Mitra. 2001. « Stimulation of Human 8-Oxoguanine-DNA Glycosylase by AP-Endonuclease: Potential Coordination of the Initial Steps in Base Excision Repair ». *Nucleic Acids Research* 29 (2): 430-38. <https://doi.org/10.1093/nar/29.2.430>.
- Hinde, Elizabeth, Xiangduo Kong, Kyoko Yokomori, et Enrico Gratton. 2014. « Chromatin Dynamics during DNA Repair Revealed by Pair Correlation Analysis of Molecular Flow in the Nucleus ». *Biophysical Journal* 107 (1): 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.027>.
- Hooke, Robert. 1665. *Micrographia, Or, Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses: With Observations and Inquiries Thereupon*. J. Martyn and J. Allestry.
- Houtsmuller, Adriaan B. 2005. « Fluorescence Recovery after Photobleaching: Application to Nuclear Proteins ». In *Microscopy Techniques: -/-*, édité par Jens Rietdorf, 177-99. Advances in Biochemical Engineering. Berlin, Heidelberg : Springer. <https://doi.org/10.1007/b102214>.
- Howard, Michael J., et Samuel H. Wilson. 2018. « DNA scanning by base excision repair enzymes and implications for pathway coordination ». *DNA repair* 71 (novembre): 101-7. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.013>.
- Hsieh, Peggy, et Yongliang Zhang. 2017. « The Devil is in the details for DNA mismatch repair ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (14): 3552-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702747114>.
- Huet, Sébastien, Christophe Lavelle, Hubert Ranchon, Pascal Carrivain, Jean-Marc Victor, et Aurélien Bancaud. 2014. « Chapter Thirteen - Relevance and Limitations of Crowding, Fractal, and Polymer Models to Describe Nuclear Architecture ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Ronald Hancock et Kwang W. Jeon, 307:443-79. New Models of the Cell Nucleus: Crowding, Entropic Forces, Phase Separation, and Fractals. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800046-5.00013-8>.

- Ignatov, A. V., Игнатов А. В, К. А. Bondarenko, Бондаренко К. А, А. V. Makarova, et Макарова А. В. 2017. « Non-Bulky Lesions in Human DNA: The Ways of Formation, Repair, and Replication ». *Acta Naturae* 9 (3): 12-26. <https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-3-12-26>.
- Ikeda, Shogo, Tapan Biswas, Rabindra Roy, Tadahide Izumi, Istvan Boldogh, Alexander Kurosky, Altaf H. Sarker, Shuji Seki, et Sankar Mitra. 1998. « Purification and Characterization of Human NTH1, a Homolog of Escherichia Coli Endonuclease III ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (34): 21585-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21585>.
- « Introduction to Polarized Light ». s. d. Nikon's MicroscopyU. Consulté le 7 septembre 2022. <https://www.microscopyu.com/techniques/polarized-light/introduction-to-polarized-light>.
- Jang, Sunbok, Namrata Kumar, Emily C. Beckwitt, Muwen Kong, Elise Fouquerel, Vesna Rapić-Otrin, Rajendra Prasad, et al. 2019. « Damage Sensor Role of UV-DDB during Base Excision Repair ». *Nature Structural & Molecular Biology* 26 (8): 695-703. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0261-7>.
- Jeppsson, Kristian, Takaharu Kanno, Katsuhiko Shirahige, et Camilla Sjögren. 2014. « The Maintenance of Chromosome Structure: Positioning and Functioning of SMC Complexes ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (9): 601-14. <https://doi.org/10.1038/nrm3857>.
- Juhász, Szilvia, Rebecca Smith, Tamás Schauer, Dóra Spekhardt, Hasan Mamar, Siham Zentout, Catherine Chapuis, Sébastien Huet, et Gyula Timinszky. 2020. « The chromatin remodeler ALC1 underlies resistance to PARP inhibitor treatment ». *Science Advances* 6 (51): eabb8626. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb8626>.
- Kamagata, Kiyoto, Yuji Itoh, et Dwiky Rendra Graha Subekti. 2020. « How p53 Molecules Solve the Target DNA Search Problem: A Review ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (3): 1031. <https://doi.org/10.3390/ijms21031031>.
- Kampmann, Martin. 2005. « Facilitated Diffusion in Chromatin Lattices: Mechanistic Diversity and Regulatory Potential ». *Molecular Microbiology* 57 (4): 889-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04707.x>.
- Kanno, Takaharu, Davide G. Berta, et Camilla Sjögren. 2015. « The Smc5/6 Complex Is an ATP-Dependent Intermolecular DNA Linker ». *Cell Reports* 12 (9): 1471-82. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.048>.
- Kemp, Patricia Auffret van der, Jean-Baptiste Charbonnier, Marc Audebert, et Serge Boiteux. 2004. « Catalytic and DNA-Binding Properties of the Human Ogg1 DNA N-Glycosylase/AP Lyase: Biochemical Exploration of H270, Q315 and F319, Three Amino Acids of the 8-Oxoguanine-Binding Pocket ». *Nucleic Acids Research* 32 (2): 570-78. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh224>.
- Kim, Hong Sook, Byung-Hak Kim, Joo Eun Jung, Chang Seok Lee, Hyun Gyu Lee, Jung Weon Lee, Kun Ho Lee, Ho Jin You, Myung-Hee Chung, et Sang-Kyu Ye. 2016. « Potential Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1 as a STAT1 Coactivator in Endotoxin-Induced Inflammatory Response ». *Free Radical Biology and Medicine* 93 (avril): 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.415>.
- Kim, Jane C, et Sergei M Mirkin. 2013. « The Balancing Act of DNA Repeat Expansions ». *Current Opinion in Genetics & Development*, Molecular and genetic bases of disease, 23 (3): 280-88. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.04.009>.

- Kim, Jong-Soo, Tatiana B. Krasieva, Hitoshi Kurumizaka, David J. Chen, A. Malcolm R. Taylor, et Kyoko Yokomori. 2005. « Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells ». *The Journal of Cell Biology* 170 (3): 341-47. <https://doi.org/10.1083/jcb.200411083>.
- Kimura, Hiroshi, et Yuko Sato. 2022. « Imaging Transcription Elongation Dynamics by New Technologies Unveils the Organization of Initiation and Elongation in Transcription Factories ». *Current Opinion in Cell Biology* 74 (février): 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2022.01.002>.
- Kitsera, Nataliya, Dimitrios Stathis, Bork Lühnsdorf, Heiko Müller, Thomas Carell, Bernd Epe, et Andriy Khobta. 2011. « 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1 ». *Nucleic Acids Research* 39 (14): 5926-34. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr163>.
- Knowles, R G, et S Moncada. 1994. « Nitric oxide synthases in mammals. » *Biochemical Journal* 298 (Pt 2): 249-58.
- Kohno, T., K. Shinmura, M. Tosaka, M. Tani, S. R. Kim, H. Sugimura, T. Nohmi, H. Kasai, et J. Yokota. 1998. « Genetic Polymorphisms and Alternative Splicing of the HOGG1 Gene, That Is Involved in the Repair of 8-Hydroxyguanine in Damaged DNA ». *Oncogene* 16 (25): 3219-25. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201872>.
- Kong, Xiangduo, Samarendra K. Mohanty, Jared Stephens, Jason T. Heale, Veronica Gomez-Godinez, Linda Z. Shi, Jong-Soo Kim, Kyoko Yokomori, et Michael W. Berns. 2009. « Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells ». *Nucleic Acids Research* 37 (9): e68. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp221>.
- Kouchakdjian, Michael, Veeraiah Bodepudi, Shinya Shibutani, Moises Eisenberg, Francis Johnson, Arthur P. Grollman, et Dinshaw J. Patel. 1991. « NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn).cntdot.dA(anti) alignment at lesion site ». *Biochemistry* 30 (5): 1403-12. <https://doi.org/10.1021/bi00219a034>.
- Kovtun, Irina V., Yuan Liu, Magnar Bjoras, Arne Klungland, Samuel H. Wilson, et Cynthia T. McMurray. 2007. « OGG1 Initiates Age-Dependent CAG Trinucleotide Expansion in Somatic Cells ». *Nature* 447 (7143): 447-52. <https://doi.org/10.1038/nature05778>.
- Krokan, Hans E., et Magnar Bjørås. 2013. « Base Excision Repair ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4): a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>.
- Kumar, Namrata, Sripriya Raja, et Bennett Van Houten. 2020. « The involvement of nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA damage ». *Nucleic Acids Research* 48 (20): 11227-43. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa777>.
- Kumar, Namrata, Arjan F. Theil, Vera Roginskaya, Yasmin Ali, Michael Calderon, Simon C. Watkins, Ryan P. Barnes, et al. 2022. « Global and Transcription-Coupled Repair of 8-OxoG Is Initiated by Nucleotide Excision Repair Proteins ». *Nature Communications* 13 (1): 974. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28642-9>.
- Kuznetsova, Alexandra A., Nikita A. Kuznetsov, Alexander A. Ishchenko, Murat K. Saparbaev, et Olga S. Fedorova. 2014. « Step-by-Step Mechanism of DNA Damage Recognition by Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1840 (1): 387-95. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.035>.

- Lan, Li, Satoshi Nakajima, Yoshitsugu Oohata, Masashi Takao, Satoshi Okano, Mitsuko Masutani, Samuel H. Wilson, et Akira Yasui. 2004. « In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (38): 13738-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406048101>.
- Lan, Li, Satoshi Nakajima, Leizhen Wei, Luxi Sun, Ching-Lung Hsieh, Robert W. Sobol, Marcel Bruchez, Bennett Van Houten, Akira Yasui, et Arthur S. Levine. 2014. « Novel method for site-specific induction of oxidative DNA damage reveals differences in recruitment of repair proteins to heterochromatin and euchromatin ». *Nucleic Acids Research* 42 (4): 2330-45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1233>.
- Lans, Hannes, Jan H. J. Hoeijmakers, Wim Vermeulen, et Jurgen A. Marteijn. 2019. « The DNA Damage Response to Transcription Stress ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (12): 766-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0169-4>.
- Lebeaupein, Théo, Hafida Sellou, Gyula Timinszky, Sébastien Huet, et 1 CNRS, UMR 6290, Institut Génétique et Développement de Rennes, Rennes, France. 2015. « Chromatin Dynamics at DNA Breaks: What, How and Why? » *AIMS Biophysics* 2 (4): 458-75. <https://doi.org/10.3934/biophy.2015.4.458>.
- Lebeaupein, Théo, Rebecca Smith, et Sébastien Huet. 2018. « 9 - The Multiple Effects of Molecular Crowding in the Cell Nucleus: From Molecular Dynamics to the Regulation of Nuclear Architecture ». In *Nuclear Architecture and Dynamics*, édité par Christophe Lavelle et Jean-Marc Victor, 2:209-32. Translational Epigenetics. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803480-4.00009-0>.
- Lebraud, Emilie, Guillaume Pinna, Capucine Siberchicot, Jordane Depagne, Didier Busso, Damiano Fantini, Lamyra Irbah, et al. 2020. « Chromatin Recruitment of OGG1 Requires Cohesin and Mediator and Is Essential for Efficient 8-OxoG Removal ». *Nucleic Acids Research* 48 (16): 9082-97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa611>.
- Lejart, Audrey, Gilles Salbert, Sébastien Huet, Audrey Lejart, Gilles Salbert, et Sébastien Huet. 2018. « Cytosine Hydroxymethylation by TET Enzymes: From the Control of Gene Expression to the Regulation of DNA Repair Mechanisms, and Back ». *AIMS Biophysics* 5 (3): 182-93. <https://doi.org/10.3934/biophy.2018.3.182>.
- Ler, Ashlynn Ai Li, et Michael P. Carty. 2021. « DNA Damage Tolerance Pathways in Human Cells: A Potential Therapeutic Target ». *Frontiers in Oncology* 11: 822500. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.822500>.
- Leven, Itai, et Yaakov Levy. 2019. « Quantifying the two-state facilitated diffusion model of protein-DNA interactions ». *Nucleic Acids Research* 47 (11): 5530-38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz308>.
- Lindahl, T., et D. E. Barnes. 2000. « Repair of Endogenous DNA Damage ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 65: 127-33. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>.
- Lindahl, Tomas. 1974. « An N-Glycosidase from Escherichia coli That Releases Free Uracil from DNA Containing Deaminated Cytosine Residues ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (9): 3649-53.
- Linn, Stuart. 1998. « Dna Damage by Iron and Hydrogen Peroxide *in Vitro* and *in Vivo* ». *Drug Metabolism Reviews* 30 (2): 313-26. <https://doi.org/10.3109/03602539808996315>.

- Lipscomb, L A, M E Peek, M L Morningstar, S M Verghis, E M Miller, A Rich, J M Essigmann, et L D Williams. 1995. « X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (3): 719-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.3.719>.
- Lisby, Michael, et Rodney Rothstein. 2009. « Choreography of Recombination Proteins during the DNA Damage Response ». *DNA Repair, Checkpoint response to DNA damage*, 8 (9): 1068-76. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.007>.
- Liu, Chao, Aditi Vyas, Muzaffer A. Kassab, Anup K. Singh, et Xiaochun Yu. 2017. « The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response ». *Nucleic Acids Research* 45 (14): 8129-41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx565>.
- Liu, Fangming, Duoqiao Wu, et Xiangdong Wang. 2019. « Roles of CTCF in Conformation and Functions of Chromosome ». *Seminars in Cell & Developmental Biology, 3D Genome and Diseases*, 90 (juin): 168-73. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.07.021>.
- Liu, Minmin, Viswanath Bandaru, Jeffrey P. Bond, Pawel Jaruga, Xiaobei Zhao, Plamen P. Christov, Cynthia J. Burrows, Carmelo J. Rizzo, Miral Dizdaroglu, et Susan S. Wallace. 2010. « The mouse ortholog of NEIL3 is a functional DNA glycosylase *in vitro* and *in vivo* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (11): 4925-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908307107>.
- López-Velázquez, G., J. Márquez, E. Ubaldo, G. Corkidi, O. Echeverría, et G. H. Vázquez Nin. 1996. « Three-Dimensional Analysis of the Arrangement of Compact Chromatin in the Nucleus of G0 Rat Lymphocytes ». *Histochemistry and Cell Biology* 105 (2): 153-61. <https://doi.org/10.1007/BF01696155>.
- Löwe, Maryna, Milara Kalacheva, Arnold J. Boersma, et Alexej Kedrov. 2020. « The More the Merrier: Effects of Macromolecular Crowding on the Structure and Dynamics of Biological Membranes ». *The FEBS Journal* 287 (23): 5039-67. <https://doi.org/10.1111/febs.15429>.
- Lu, R., H. M. Nash, et G. L. Verdine. 1997. « A Mammalian DNA Repair Enzyme That Excises Oxidatively Damaged Guanines Maps to a Locus Frequently Lost in Lung Cancer ». *Current Biology: CB* 7 (6): 397-407. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00187-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00187-4).
- Luger, Karolin, Mekonnen L. Dechassa, et David J. Tremethick. 2012. « New Insights into Nucleosome and Chromatin Structure: An Ordered State or a Disordered Affair? » *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (7): 436-47. <https://doi.org/10.1038/nrm3382>.
- Luger, Karolin, Armin W. Mäder, Robin K. Richmond, David F. Sargent, et Timothy J. Richmond. 1997. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution ». *Nature* 389 (6648): 251-60. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- Lukas, Claudia, Jacob Falck, Jirina Bartkova, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 2003. « Distinct Spatiotemporal Dynamics of Mammalian Checkpoint Regulators Induced by DNA Damage ». *Nature Cell Biology* 5 (3): 255-60. <https://doi.org/10.1038/ncb945>.
- Mabley, Jon G., Pál Pacher, Amitabha Deb, Rebecca Wallace, Rhoderick H. Elder, et Csaba Szabó. 2005. « Potential Role for 8-Oxoguanine DNA Glycosylase in Regulating Inflammation ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (2): 290-92. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2278fje>.

- Madireddy, Advaita, et Jeannine Gerhardt. 2017. « Replication Through Repetitive DNA Elements and Their Role in Human Diseases ». In *DNA Replication: From Old Principles to New Discoveries*, édité par Hisao Masai et Marco Foiani, 549-81. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6955-0_23.
- Makhdoumi, Pouran, Hooshyar Hossini, Ghulam Md Ashraf, et Mojtaba Limoe. 2019. « Molecular Mechanism of Aniline Induced Spleen Toxicity and Neuron Toxicity in Experimental Rat Exposure: A Review ». *Current Neuropharmacology* 17 (3): 201-13. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180803164238>.
- Marenstein, Dina R., Michael K. Chan, Alvin Altamirano, Ashis K. Basu, Robert J. Boorstein, Richard P. Cunningham, et George W. Teebor. 2003. « Substrate Specificity of Human Endonuclease III (HNTH1): EFFECT OF HUMAN APE1 ON HNTH1 ACTIVITY * ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (11): 9005-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212168200>.
- Markkanen, Enni. 2017. « Not Breathing Is Not an Option: How to Deal with Oxidative DNA Damage ». *DNA Repair* 59 (novembre): 82-105. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.09.007>.
- Masaoka, Aya, Mayumi Matsubara, Rei Hasegawa, Tamon Tanaka, Satofumi Kurisu, Hiroaki Terato, Yoshihiko Ohyama, Naoko Karino, Akira Matsuda, et Hiroshi Ide. 2003. « Mammalian 5-Formyluracil–DNA Glycosylase. 2. Role of SMUG1 Uracil–DNA Glycosylase in Repair of 5-Formyluracil and Other Oxidized and Deaminated Base Lesions ». *Biochemistry* 42 (17): 5003-12. <https://doi.org/10.1021/bi0273213>.
- Matthews, Helen K., Cosetta Bertoli, et Robertus A. M. de Bruin. 2022. « Cell Cycle Control in Cancer ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 23 (1): 74-88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>.
- McCulloch, Scott D., et Thomas A. Kunkel. 2008. « The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases ». *Cell research* 18 (1): 148-61. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.4>.
- McKinnon, Peter J. 2016. « Topoisomerases and the Regulation of Neural Function ». *Nature Reviews Neuroscience* 17 (11): 673-79. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.101>.
- Mehta, Anuja, et James E. Haber. 2014. « Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (9): a016428. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428>.
- Menoni, Hervé, Didier Gasparutto, Ali Hamiche, Jean Cadet, Stefan Dimitrov, Philippe Bouvet, et Dimitar Angelov. 2007. « ATP-Dependent Chromatin Remodeling Is Required for Base Excision Repair in Conventional but Not in Variant H2A.Bbd Nucleosomes ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (17): 5949-56. <https://doi.org/10.1128/MCB.00376-07>.
- Menoni, Hervé, Manu Shubhdarshan Shukla, Véronique Gerson, Stefan Dimitrov, et Dimitar Angelov. 2012. « Base Excision Repair of 8-OxoG in Dinucleosomes ». *Nucleic Acids Research* 40 (2): 692-700. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr761>.
- Michelman-Ribeiro, Ariel, Davide Mazza, Tilman Rosales, Timothy J. Stasevich, Hacene Boukari, Vikas Rishi, Charles Vinson, Jay R. Knutson, et James G. McNally. 2009. « Direct Measurement of Association and Dissociation Rates of DNA Binding in Live Cells by Fluorescence Correlation Spectroscopy ». *Biophysical Journal* 97 (1): 337-46. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.04.027>.

- Millán-Zambrano, Gonzalo, Adam Burton, Andrew J. Bannister, et Robert Schneider. 2022. « Histone Post-Translational Modifications — Cause and Consequence of Genome Function ». *Nature Reviews Genetics* 23 (9): 563-80. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7>.
- Miller, Dennis M, Garry R Buettner, et Steven D Aust. 1990. « Transition Metals as Catalysts of “Autoxidation” Reactions ». *Free Radical Biology and Medicine* 8 (1): 95-108. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90148-C](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90148-C).
- Misteli, Tom. 2020. « The self-organizing genome: Principles of genome architecture and function ». *Cell* 183 (1): 28-45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.014>.
- Mitelman, Felix, Bertil Johansson, et Fredrik Mertens. 2007. « The Impact of Translocations and Gene Fusions on Cancer Causation ». *Nature Reviews Cancer* 7 (4): 233-45. <https://doi.org/10.1038/nrc2091>.
- Møller, Peter, Kim Jantzen, Mille Løhr, Maria Helena Andersen, Ditte Marie Jensen, Martin Roursgaard, Pernille Høgh Danielsen, Annie Jensen, et Steffen Loft. 2018. « Searching for assay controls for the Fpg- and hOGG1-modified comet assay ». *Mutagenesis* 33 (1): 9-19. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex015>.
- Moore, Stephen P. G., Joshua Kruchten, Kimberly J. Toomire, et Phyllis R. Strauss. 2016. « Transcription Factors and DNA Repair Enzymes Compete for Damaged Promoter Sites * ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (11): 5452-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672733>.
- Morreall, Jordan, Kristin Limpose, Clayton Sheppard, Yoke Wah Kow, Erica Werner, et Paul W. Doetsch. 2015. « Inactivation of a common OGG1 variant by TNF-alpha in mammalian cells ». *DNA repair* 26 (février): 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.11.007>.
- Mourão, Márcio A., Joe B. Hakim, et Santiago Schnell. 2014. « Connecting the Dots: The Effects of Macromolecular Crowding on Cell Physiology ». *Biophysical Journal* 107 (12): 2761-66. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.10.051>.
- Mueller, Veronika, Alf Honigmann, Christian Ringemann, Rebecca Medda, Günter Schwarzmann, et Christian Eggeling. 2013. « Chapter One - FCS in STED Microscopy: Studying the Nanoscale of Lipid Membrane Dynamics ». In *Methods in Enzymology*, édité par Sergey Y. Tetin, 519:1-38. Fluorescence Fluctuation Spectroscopy (FFS), Part B. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405539-1.00001-4>.
- Mueller-Planitz, Felix, Henrike Klinker, et Peter B. Becker. 2013. « Nucleosome Sliding Mechanisms: New Twists in a Looped History ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (9): 1026-32. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2648>.
- Mullaney, Julianne M., Ryan E. Mills, W. Stephen Pittard, et Scott E. Devine. 2010. « Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes ». *Human Molecular Genetics* 19 (R2): R131-36. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq400>.
- Muñoz-Espín, Daniel, et Manuel Serrano. 2014. « Cellular Senescence: From Physiology to Pathology ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (7): 482-96. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>.
- Nabel, Christopher S., Huijue Jia, Yu Ye, Li Shen, Hana L. Goldschmidt, James T. Stivers, Yi Zhang, et Rahul M. Kohli. 2012. « AID/APOBEC Deaminases Disfavor Modified Cytosines Implicated in DNA Demethylation ». *Nature Chemical Biology* 8 (9): 751-58. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1042>.

- Nakabeppu, Yusaku. 2014. « Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (7): 12543-57. <https://doi.org/10.3390/ijms150712543>.
- Nakabeppu, Yusaku, Eiko Ohta, et Nona Abolhassani. 2017. « MTH1 as a Nucleotide Pool Sanitizing Enzyme: Friend or Foe? » *Free Radical Biology & Medicine* 107 (juin): 151-58. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.002>.
- Nakabeppu, Yusaku, Daisuke Tsuchimoto, Hiroo Yamaguchi, et Kunihiko Sakumi. 2007. « Oxidative Damage in Nucleic Acids and Parkinson's Disease ». *Journal of Neuroscience Research* 85 (5): 919-34. <https://doi.org/10.1002/jnr.21191>.
- Nash, Huw M., Rongzhen Lu, William S. Lane, et Gregory L. Verdinel. 1997. « The Critical Active-Site Amine of the Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase, HOGg1: Direct Identification, Ablation and Chemical Reconstitution ». *Chemistry & Biology* 4 (9): 693-702. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90225-8](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90225-8).
- Neddermann, P., et J. Jiricny. 1993. « The Purification of a Mismatch-Specific Thymine-DNA Glycosylase from HeLa Cells. » *Journal of Biological Chemistry* 268 (28): 21218-24.
- Neddermann, Petra, Paola Gallinari, Teresa Lettieri, Daniel Schmid, Oanh Truong, J. Justin Hsuan, Karin Wiebauer, et Josef Jiricny. 1996. « Cloning and Expression of Human G/T Mismatch-Specific Thymine-DNA Glycosylase ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (22): 12767-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.12767>.
- Normanno, Davide, Lydia Boudarène, Claire Dugast-Darzacq, Jiji Chen, Christian Richter, Florence Proux, Olivier Bénichou, Raphaël Voituriez, Xavier Darzacq, et Maxime Dahan. 2015. « Probing the Target Search of DNA-Binding Proteins in Mammalian Cells Using TetR as Model Searcher ». *Nature Communications* 6 (juillet): 7357. <https://doi.org/10.1038/ncomms8357>.
- Normanno, Davide, Maxime Dahan, et Xavier Darzacq. 2012. « Intra-Nuclear Mobility and Target Search Mechanisms of Transcription Factors: A Single-Molecule Perspective on Gene Expression ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, Nuclear Transport and RNA Processing*, 1819 (6): 482-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.02.001>.
- Ohno, Mizuki, Tomofumi Miura, Masato Furuichi, Yohei Tominaga, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiko Sakumi, et Yusaku Nakabeppu. 2006. « A Genome-Wide Distribution of 8-Oxoguanine Correlates with the Preferred Regions for Recombination and Single Nucleotide Polymorphism in the Human Genome ». *Genome Research* 16 (5): 567-75. <https://doi.org/10.1101/gr.4769606>.
- Ou, Horng D., Sébastien Phan, Thomas J. Deerinck, Andrea Thor, Mark H. Ellisman, et Clodagh C. O'Shea. 2017. « ChromEMT: Visualizing 3D Chromatin Structure and Compaction in Interphase and Mitotic Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 357 (6349): eaag0025. <https://doi.org/10.1126/science.aag0025>.
- Pan, Lang, Bing Zhu, Wenjing Hao, Xianlu Zeng, Spiros A. Vlahopoulos, Tapas K. Hazra, Muralidhar L. Hegde, et al. 2016. « Oxidized Guanine Base Lesions Function in 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1-Mediated Epigenetic Regulation of Nuclear Factor KB-Driven Gene Expression ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (49): 25553-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751453>.

- Park, C. S., F. Y. Wu, et C. W. Wu. 1982. « Molecular Mechanism of Promoter Selection in Gene Transcription. II. Kinetic Evidence for Promoter Search by a One-Dimensional Diffusion of RNA Polymerase Molecule along the DNA Template ». *The Journal of Biological Chemistry* 257 (12): 6950-56.
- Parlanti, Eleonora, Mariarosaria D'Errico, Paolo Degan, Angelo Calcagnile, Andrea Zijno, Ingrid van der Pluijm, Gijsbertus T. J. van der Horst, Denis S. F. Biard, et Eugenia Dogliotti. 2012. « The Cross Talk between Pathways in the Repair of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanine in Mouse and Human Cells ». *Free Radical Biology and Medicine* 53 (11): 2171-77. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.593>.
- Pastukh, Viktor, Justin T. Roberts, David W. Clark, Gina C. Bardwell, Mita Patel, Abu-Bakr Al-Mehdi, Glen M. Borchert, et Mark N. Gillespie. 2015. « An oxidative DNA “damage” and repair mechanism localized in the VEGF promoter is important for hypoxia-induced VEGF mRNA expression ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 309 (11): L1367-75. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00236.2015>.
- Perrin, Jean. 1909. « Annales de chimie et de physique ». Gallica. 1909. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k349481>.
- Petruzzella, Vittoria, et Sergio Papa. 2002. « Mutations in Human Nuclear Genes Encoding for Subunits of Mitochondrial Respiratory Complex I: The NDUFS4 Gene ». *Gene*, Papers presented at the International Meeting « Mitochondria: Evolution, Genomics, Homeostasis and Pathology », Selva di Fasano (BR, Italy), 9-12 May 2001, 286 (1): 149-54. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00810-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00810-1).
- Phillips, Rob, Jane Kondev, et Julie Theriot. 2008. *Physical Biology of the Cell*. 1st edition. New York: Garland Science.
- Pisoschi, Aurelia Magdalena, et Aneta Pop. 2015. « The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 97 (juin): 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.
- Pisoschi, Aurelia Magdalena, Aneta Pop, Florin Iordache, Loredana Stanca, Gabriel Predoi, et Andreea Iren Serban. 2021. « Oxidative Stress Mitigation by Antioxidants - An Overview on Their Chemistry and Influences on Health Status ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 209 (janvier): 112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>.
- Pommier, Yves. 2006. « Topoisomerase I Inhibitors: Camptothecins and Beyond ». *Nature Reviews Cancer* 6 (10): 789-802. <https://doi.org/10.1038/nrc1977>.
- Pommier, Yves, André Nussenzweig, Shunichi Takeda, et Caroline Austin. 2022. « Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, février, 1-21. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00452-3>.
- Prasad, Rajendra, David D. Shock, William A. Beard, et Samuel H. Wilson. 2010. « Substrate Channeling in Mammalian Base Excision Repair Pathways: Passing the Baton ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (52): 40479-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155267>.
- Prasuhn, Jannik, Ryan L. Davis, et Kishore R. Kumar. 2021. « Targeting Mitochondrial Impairment in Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.615461>.

- Prokhorova, Evgeniia, Florian Zobel, Rebecca Smith, Siham Zentout, Ian Gibbs-Seymour, Kira Schützenhofer, Alessandra Peters, et al. 2021. « Serine-linked PARP1 auto-modification controls PARP inhibitor response ». *Nature Communications* 12 (juillet): 4055. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24361-9>.
- Putnam, Christopher D. 2021. « Strand Discrimination in DNA Mismatch Repair ». *DNA repair* 105 (septembre): 103161. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103161>.
- Radak, Zsolt, Zhongfu Zhao, Sataro Goto, et Erika Koltai. 2011. « Age-Associated Neurodegeneration and Oxidative Damage to Lipids, Proteins and DNA ». *Molecular Aspects of Medicine, Oxidative Damage and Disease*, 32 (4): 305-15. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.010>.
- Radicella, J. Pablo, Claudine Dherin, Chantal Desmaze, Maurice S. Fox, et Serge Boiteux. 1997. « Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (15): 8010-15.
- Radom, Christopher T., Anirban Banerjee, et Gregory L. Verdine. 2007. « Structural Characterization of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase Variants Bearing Active Site Mutations ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (12): 9182-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608989200>.
- Ramalho, Adriana T., M. P. Curado, et A. T. Natarajan. 1995. « Lifespan of Human Lymphocytes Estimated during a Six Year Cytogenetic Follow-up of Individuals Accidentally Exposed in the 1987 Radiological Accident in Brazil ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 331 (1): 47-54. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00049-O](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00049-O).
- Rauscher, Robert, et Zoya Ignatova. 2018. « Timing during Translation Matters: Synonymous Mutations in Human Pathologies Influence Protein Folding and Function ». *Biochemical Society Transactions* 46 (4): 937-44. <https://doi.org/10.1042/BST20170422>.
- Remon, Jordi, Lizza E. L. Hendriks, Andres F. Cardona, et Benjamin Besse. 2020. « EGFR Exon 20 Insertions in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A New History Begins ». *Cancer Treatment Reviews* 90 (novembre): 102105. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102105>.
- Ren, Gang, et Keji Zhao. 2019. « CTCF and cellular heterogeneity ». *Cell & Bioscience* 9 (octobre): 83. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0347-2>.
- Riddell, Imogen A. 2018. « Cisplatin and Oxaliplatin: Our Current Understanding of Their Actions ». *Metal Ions in Life Sciences* 18 (février): /books/9783110470734/9783110470734-007/9783110470734-007.xml. <https://doi.org/10.1515/9783110470734-007>.
- Ries, Jonas, et Petra Schwille. 2012. « Fluorescence Correlation Spectroscopy ». *BioEssays* 34 (5): 361-68. <https://doi.org/10.1002/bies.201100111>.
- Riggs, Arthur D., Suzanne Bourgeois, et Melvin Cohn. 1970. « The Lac Repressor-Operator Interaction: III. Kinetic Studies ». *Journal of Molecular Biology* 53 (3): 401-17. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90074-4).
- Robey-Bond, Susan M., Ramiro Barrantes-Reynolds, Jeffrey P. Bond, Susan S. Wallace, et Viswanath Bandaru. 2008. « *Clostridium acetobutylicum* 8-Oxoguanine DNA Glycosylase (Ogg) Differs from Eukaryotic Oggs with Respect to Opposite Base Discrimination ». *Biochemistry* 47 (29): 7626-36. <https://doi.org/10.1021/bi800162e>.

- Roldán-Arjona, Teresa, Ying-Fei Wei, Kenneth C. Carter, Arne Klungland, Catherine Anselmino, Rui-Ping Wang, Meena Augustus, et Tomas Lindahl. 1997. « Molecular Cloning and Functional Expression of a Human CDNA Encoding the Antimutator Enzyme 8-Hydroxyguanine-DNA Glycosylase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (15): 8016. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.15.8016>.
- Rosenquist, Thomas A., Dmitry O. Zharkov, et Arthur P. Grollman. 1997. « Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14): 7429-34.
- Rothkamm, Kai, Stephen Barnard, Jayne Moquet, Michele Ellender, Zohaib Rana, et Susanne Burdak-Rothkamm. 2015. « DNA Damage Foci: Meaning and Significance ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 56 (6): 491-504. <https://doi.org/10.1002/em.21944>.
- Rouquette, Jacques, Christel Genoud, Gerardo H. Vazquez-Nin, Bernd Kraus, Thomas Cremer, et Stanislav Fakan. 2009. « Revealing the High-Resolution Three-Dimensional Network of Chromatin and Interchromatin Space: A Novel Electron-Microscopic Approach to Reconstructing Nuclear Architecture ». *Chromosome Research* 17 (6): 801. <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9070-x>.
- Rowland, Meng M., Joseph D. Schonhoft, Paige L. McKibbin, Sheila S. David, et James T. Stivers. 2014. « Microscopic mechanism of DNA damage searching by hOGG1 ». *Nucleic Acids Research* 42 (14): 9295-9303. <https://doi.org/10.1093/nar/gku621>.
- Saparbaev, M. K., et D. O. Zharkov. 2017. « Glycosylase Repair☆ ». In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06481-5>.
- Sauna, Zuben E., et Chava Kimchi-Sarfaty. 2011. « Understanding the Contribution of Synonymous Mutations to Human Disease ». *Nature Reviews Genetics* 12 (10): 683-91. <https://doi.org/10.1038/nrg3051>.
- Scalera, Claudia, Giulio Ticli, Ilaria Dutto, Ornella Cazzalini, Lucia A. Stivala, et Ennio Prosperi. 2021. « Transcriptional Stress Induces Chromatin Relocation of the Nucleotide Excision Repair Factor XPG ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (12): 6589. <https://doi.org/10.3390/ijms22126589>.
- Schmidt, Matthias, Alexander Rohe, Charlott Platzer, Abdulkarim Najjar, Frank Erdmann, et Wolfgang Sippl. 2017. « Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases ». *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 22 (12): 2045. <https://doi.org/10.3390/molecules22122045>.
- Schrank, Benjamin, et Jean Gautier. 2019. « Assembling nuclear domains: Lessons from DNA repair ». *Journal of Cell Biology* 218 (8): 2444-55. <https://doi.org/10.1083/jcb.201904202>.
- Schwille, Petra, et Elke Haustein. 2001. « Fluorescence Correlation Spectroscopy - An Introduction to its Concepts and Applications ». *Spectroscopy* 94(22) (janvier).
- Scipioni, L., L. Lanzaó, A. Diaspro, et E. Gratton. 2018. « Comprehensive correlation analysis for super-resolution dynamic fingerprinting of cellular compartments using the Zeiss Airyscan detector ». *Nature Communications* 9 (novembre): 5120. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07513-2>.

- Scully, Ralph, Arvind Panday, Rajula Elango, et Nicholas A. Willis. 2019. « DNA double strand break repair pathway choice in somatic mammalian cells ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 20 (11): 698-714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>.
- Seifermann, Marco, et Bernd Epe. 2017. « Oxidatively Generated Base Modifications in DNA: Not Only Carcinogenic Risk Factor but Also Regulatory Mark? » *Free Radical Biology and Medicine, Oxidative DNA Damage & Repair*, 107 (juin): 258-65. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.018>.
- Sellou, Hafida, Théo Lebeauvin, Catherine Chapuis, Rebecca Smith, Anna Hegele, Hari R. Singh, Marek Kozlowski, et al. 2016. « The Poly(ADP-Ribose)-Dependent Chromatin Remodeler Alc1 Induces Local Chromatin Relaxation upon DNA Damage ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (24): 3791-99. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0269>.
- Shah, Kalpit, Yi Cheng, Brian Hahn, Robert Bridges, Neil A. Bradbury, et David M. Mueller. 2015. « Synonymous Codon Usage Affects the Expression of Wild Type and F508del CFTR ». *Journal of Molecular Biology* 427 (6, Part B): 1464-79. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.003>.
- Shay, Jerry W. 2018. « Telomeres and Aging ». *Current Opinion in Cell Biology, Cell Nucleus*, 52 (juin): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.12.001>.
- Shibutani, Shinya, Masaru Takeshita, et Arthur P. Grollman. 1991. « Insertion of Specific Bases during DNA Synthesis Past the Oxidation-Damaged Base 8-OxodG ». *Nature* 349 (6308): 431-34. <https://doi.org/10.1038/349431a0>.
- Shigdel, Uddhav K., Victor Ovchinnikov, Seung-Joo Lee, Jenny A. Shih, Martin Karplus, Kwangho Nam, et Gregory L. Verdine. 2020. « The Trajectory of Intrahelical Lesion Recognition and Extrusion by the Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase ». *Nature Communications* 11 (1): 4437. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18290-2>.
- Shin, Jaeoh, et Anatoly B. Kolomeisky. 2019. « Target search on DNA by interacting molecules: First-passage approach ». *The Journal of Chemical Physics* 151 (12): 125101. <https://doi.org/10.1063/1.5123988>.
- Siametis, Athanasios, George Niotis, et George A. Garinis. 2021. « DNA Damage and the Aging Epigenome ». *Journal of Investigative Dermatology* 141 (4): 961-67. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.10.006>.
- Sies, Helmut. 2017. « Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress ». *Redox Biology* 11 (janvier): 613-19. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>.
- Sigismund, Sara, Daniele Avanzato, et Letizia Lanzetti. 2018. « Emerging functions of the EGFR in cancer ». *Molecular Oncology* 12 (1): 3-20. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>.
- Simonelli, Valeria, Serena Camerini, Filomena Mazzei, Barbara Van Loon, Alessandra Allione, Mariarosaria D'Errico, Flavia Barone, et al. 2013. « Genotype–Phenotype Analysis of S326C OGG1 Polymorphism: A Risk Factor for Oxidative Pathologies ». *Free Radical Biology and Medicine* 63 (octobre): 401-9. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.031>.
- Singh, Jenny Kaur, Rebecca Smith, Magdalena B. Rother, Anton J. L. de Groot, Wouter W. Wiegant, Kees Vreeken, Ostiane D'Augustin, et al. 2021. « Zinc Finger Protein ZNF384 Is an Adaptor

of Ku to DNA during Classical Non-Homologous End-Joining ». *Nature Communications* 12 (1): 6560. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26691-0>.

- Sirbu, Bianca M., et David Cortez. 2013. « DNA Damage Response: Three Levels of DNA Repair Regulation ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (8): a012724. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012724>.
- Slupphaug, Geir, Ingrid Eftedal, Bodil Kavli, Sangeeta Bharati, Nils M. Helle, Terje Haug, David W. Levine, et Hans E. Krokan. 1995. « Properties of a Recombinant Human Uracil-DNA Glycosylase from the UNG Gene and Evidence that UNG Encodes the Major Uracil-DNA Glycosylase ». *Biochemistry* 34 (1): 128-38. <https://doi.org/10.1021/bi00001a016>.
- Slupska, M M, C Baikalov, W M Luther, J H Chiang, Y F Wei, et J H Miller. 1996. « Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. » *Journal of Bacteriology* 178 (13): 3885-92.
- Smith, Hannah L., Harriet Southgate, Deborah A. Tweddle, et Nicola J. Curtin. 2020. « DNA Damage Checkpoint Kinases in Cancer ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 22: e2. <https://doi.org/10.1017/erm.2020.3>.
- Smith, Rebecca, Théo Lebeauvin, Szilvia Juhász, Catherine Chapuis, Ostiane D'Augustin, Stéphanie Dutertre, Peter Burkovics, Christian Biertümpfel, Gyula Timinszky, et Sébastien Huet. 2019. « Poly(ADP-Ribose)-Dependent Chromatin Unfolding Facilitates the Association of DNA-Binding Proteins with DNA at Sites of Damage ». *Nucleic Acids Research* 47 (21): 11250-67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz820>.
- Smoluchowski, M. v. 1918. « Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen ». *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 92U (1): 129-68. <https://doi.org/10.1515/zpch-1918-9209>.
- Sobhy, Haitham, Rajendra Kumar, Jacob Lewerentz, Ludvig Lizana, et Per Stenberg. 2019. « Highly Interacting Regions of the Human Genome Are Enriched with Enhancers and Bound by DNA Repair Proteins ». *Scientific Reports* 9 (1): 4577. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40770-9>.
- Solarczyk, Kamil J., Mirosław Zarębski, et Jurek W. Dobrucki. 2012. « Inducing Local DNA Damage by Visible Light to Study Chromatin Repair ». *DNA Repair* 11 (12): 996-1002. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.09.008>.
- Squadrito, Giuseppe L., et William A. Pryor. 1998. « Oxidative Chemistry of Nitric Oxide: The Roles of Superoxide, Peroxynitrite, and Carbon Dioxide ». *Free Radical Biology and Medicine* 25 (4): 392-403. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00095-1).
- Steensel, Bas van, et Andrew S. Belmont. 2017. « Lamina-associated domains: links with chromosome architecture, heterochromatin and gene repression ». *Cell* 169 (5): 780-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.022>.
- Stine, Zachary E., Zandra E. Walton, Brian J. Altman, Annie L. Hsieh, et Chi V. Dang. 2015. « MYC, Metabolism, and Cancer ». *Cancer discovery* 5 (10): 1024-39. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0507>.
- Stracy, Mathew, Jakob Schweizer, David J. Sherratt, Achillefs N. Kapanidis, Stephan Uphoff, et Christian Lesterlin. 2021. « Transient non-specific DNA binding dominates the target search

of bacterial DNA-binding proteins ». *Molecular Cell* 81 (7): 1499-1514.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.039>.

Sugimura, H., T. Kohno, K. Wakai, K. Nagura, K. Genka, H. Igarashi, B. J. Morris, et al. 1999. « HOGG1 Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility ». *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 8 (8): 669-74.

Sutherland, William. 1905. « LXXV. A dynamical theory of diffusion for non-electrolytes and the molecular mass of albumin ». *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 9 (54): 781-85. <https://doi.org/10.1080/14786440509463331>.

Tafvizi, Anahita, Leonid A. Mirny, et Antoine M. van Oijen. 2011. « Dancing on DNA: Kinetic Aspects of Search Processes on DNA ». *ChemPhysChem* 12 (8): 1481-89. <https://doi.org/10.1002/cphc.201100112>.

Takao, Masashi, Qiu-Mei Zhang, Shuji Yonei, et Akira Yasui. 1999. « Differential Subcellular Localization of Human MutY Homolog (HMYH) and the Functional Activity of Adenine:8-Oxoguanine DNA Glycosylase ». *Nucleic Acids Research* 27 (18): 3638-44. <https://doi.org/10.1093/nar/27.18.3638>.

Tamirat, Mahlet Z., Marika Koivu, Klaus Elenius, et Mark S. Johnson. 2019. « Structural characterization of EGFR exon 19 deletion mutation using molecular dynamics simulation ». *PLoS ONE* 14 (9): e0222814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222814>.

Tarrant, Daniel, et Tobias von der Haar. 2014. « Synonymous Codons, Ribosome Speed, and Eukaryotic Gene Expression Regulation ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (21): 4195-4206. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1684-2>.

Tchou, J., H. Kasai, S. Shibutani, M. H. Chung, J. Laval, A. P. Grollman, et S. Nishimura. 1991. « 8-Oxoguanine (8-Hydroxyguanine) DNA Glycosylase and Its Substrate Specificity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (11): 4690-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4690>.

Terry, B. J., W. E. Jack, et P. Modrich. 1985. « Facilitated Diffusion during Catalysis by EcoRI Endonuclease. Nonspecific Interactions in EcoRI Catalysis ». *The Journal of Biological Chemistry* 260 (24): 13130-37.

« The Diffraction Barrier in Optical Microscopy ». s. d. Nikon's MicroscopyU. Consulté le 8 septembre 2022. <https://www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/the-diffraction-barrier-in-optical-microscopy>.

« The Diffraction Limit of Light | Cherry Biotech ». s. d. Consulté le 6 octobre 2022. <https://www.cherrybiotech.com/scientific-note/microscopy/super-resolution-microscopy-the-diffraction-limit-of-light>.

Thoma, F., T. Koller, et A. Klug. 1979. « Involvement of Histone H1 in the Organization of the Nucleosome and of the Salt-Dependent Superstructures of Chromatin. » *The Journal of Cell Biology* 83 (2): 403-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.83.2.403>.

Tiwari, Vinod, et David M. Wilson. 2019. « DNA Damage and Associated DNA Repair Defects in Disease and Premature Aging ». *American Journal of Human Genetics* 105 (2): 237-57. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.06.005>.

- Touati, Eliette, Valérie Michel, Jean-Michel Thiberge, Patrick Avé, Michel Huerre, Franck Bourgade, Arne Klungland, et Agnès Labigne. 2006. « Deficiency in OGG1 Protects against Inflammation and Mutagenic Effects Associated with H. Pylori Infection in Mouse ». *Helicobacter* 11 (5): 494-505. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2006.00442.x>.
- Travers, A. A. 1990. « Why Bend DNA? » *Cell* 60 (2): 177-80. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90729-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90729-x).
- Uhlmann, Frank. 2016. « SMC Complexes: From DNA to Chromosomes ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (7): 399-412. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.30>.
- Ui, Ayako, Natsuko Chiba, et Akira Yasui. 2020. « Relationship among DNA double-strand break (DSB), DSB repair, and transcription prevents genome instability and cancer ». *Cancer Science* 111 (5): 1443-51. <https://doi.org/10.1111/cas.14404>.
- Valko, M., H. Morris, et M. T. D. Cronin. 2005. « Metals, Toxicity and Oxidative Stress ». *Current Medicinal Chemistry* 12 (10): 1161-1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>.
- Venkatesan, Shriram, Adayapalam T. Natarajan, et M. Prakash Hande. 2015. « Chromosomal Instability—Mechanisms and Consequences ». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Insights into formation and consequences of chromosome aberrations: Report on the 11th International Symposium on Chromosomal Aberrations (ISCA 11), Rhodes , Greece, September 12-14, 2014, 793 (novembre): 176-84. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.08.008>.
- Vestergaard, Christian L., Paul C. Blainey, et Henrik Flyvbjerg. 2018. « Single-Particle Trajectories Reveal Two-State Diffusion-Kinetics of HOGG1 Proteins on DNA ». *Nucleic Acids Research* 46 (5): 2446-58. <https://doi.org/10.1093/nar/gky004>.
- Vidal, Antonio E., Ian D. Hickson, Serge Boiteux, et J. Pablo Radicella. 2001. « Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step ». *Nucleic Acids Research* 29 (6): 1285-92.
- Vijg, Jan. 2021. « From DNA Damage to Mutations: All Roads Lead to Aging ». *Ageing Research Reviews* 68 (juillet): 101316. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101316>.
- Villaseñor, Rodrigo, et Tuncay Baubec. 2021. « Regulatory Mechanisms Governing Chromatin Organization and Function ». *Current Opinion in Cell Biology*, Cell Nucleus, 70 (juin): 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.10.015>.
- Visnes, Torkild, Armando Cázares-Körner, Wenjing Hao, Olov Wallner, Geoffrey Masuyer, Olga Loseva, Oliver Mortusewicz, et al. 2018. « Small-Molecule Inhibitor of OGG1 Suppresses Proinflammatory Gene Expression and Inflammation ». *Science* 362 (6416): 834-39. <https://doi.org/10.1126/science.aar8048>.
- Vítor, Alexandra C., Pablo Huertas, Gaëlle Legube, et Sérgio F. de Almeida. 2020. « Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 7 (février): 24. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00024>.
- Wachsmuth, Malte, Christian Conrad, Jutta Bulkescher, Birgit Koch, Robert Mahen, Mayumi Isokane, Rainer Pepperkok, et Jan Ellenberg. 2015. « High-Throughput Fluorescence Correlation Spectroscopy Enables Analysis of Proteome Dynamics in Living Cells ». *Nature Biotechnology* 33 (4): 384-89. <https://doi.org/10.1038/nbt.3146>.

- Wachsmuth, Malte, Tobias A. Knoch, et Karsten Rippe. 2016. « Dynamic properties of independent chromatin domains measured by correlation spectroscopy in living cells ». *Epigenetics & Chromatin* 9: 57. <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0093-1>.
- Wachsmuth, Malte, Waldemar Waldeck, et Jörg Langowski. 2000. « Anomalous Diffusion of Fluorescent Probes inside Living Cell Nuclei Investigated by Spatially-Resolved Fluorescence Correlation Spectroscopy » Edited by W. Baumeister ». *Journal of Molecular Biology* 298 (4): 677-89. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3692>.
- Waithe, Dominic, Falk Schneider, Jakub Chojnacki, Mathias P. Clausen, Dilip Shrestha, Jorge Bernardino de la Serna, et Christian Eggeling. 2018. « Optimized Processing and Analysis of Conventional Confocal Microscopy Generated Scanning FCS Data ». *Methods, Developments in Fluorescence Correlation Spectroscopy and related techniques*, 140-141 (mai): 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.09.010>.
- Wang, Katarina, Marah Maayah, Joann B. Sweasy, et Khadijeh S. Alnajjar. 2021. « The Role of Cysteines in the Structure and Function of OGG1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 296 (juin): 100093. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016126>.
- Wang, Ruoxi, Wenjing Hao, Lang Pan, Istvan Boldogh, et Xueqing Ba. 2018. « The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (20): 3741-50. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2887-8>.
- Wang, Xiujuan, Xiaomu Wei, Bram Thijssen, Jishnu Das, Steven M. Lipkin, et Haiyuan Yu. 2012. « Three-Dimensional Reconstruction of Protein Networks Provides Insight into Human Genetic Disease ». *Nature Biotechnology* 30 (2): 159-64. <https://doi.org/10.1038/nbt.2106>.
- Wang, Zhao, Xuejing Wang, Ying Zhang, Weili Xu, et Xiaojun Han. 2021. « Principles and Applications of Single Particle Tracking in Cell Research ». *Small* 17 (11): 2005133. <https://doi.org/10.1002/sml.202005133>.
- Weiss, Matthias. 2008. « Probing the Interior of Living Cells with Fluorescence Correlation Spectroscopy ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1130 (1): 21-27. <https://doi.org/10.1196/annals.1430.002>.
- . 2014. « Chapter Eleven - Crowding, Diffusion, and Biochemical Reactions ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Ronald Hancock et Kwang W. Jeon, 307:383-417. New Models of the Cell Nucleus: Crowding, Entropic Forces, Phase Separation, and Fractals. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800046-5.00011-4>.
- White, Melanie D., Juan F. Angiolini, Yanina D. Alvarez, Gurpreet Kaur, Ziqing W. Zhao, Esteban Mocskos, Luciana Bruno, Stephanie Bissiere, Valeria Levi, et Nicolas Plachta. 2016. « Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo ». *Cell* 165 (1): 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.032>.
- Wiederhold, Lee, John B. Leppard, Padmini Kedar, Feridoun Karimi-Busheri, Aghdass Rasouli-Nia, Michael Weinfeld, Alan E. Tomkinson, et al. 2004. « AP Endonuclease-Independent DNA Base Excision Repair in Human Cells ». *Molecular Cell* 15 (2): 209-20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.003>.
- Will, Olaf, Elmar Gocke, Inge Eckert, Ina Schulz, Michael Pflaum, Hanns-Christian Mahler, et Bernd Epe. 1999. « Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022 ». *Mutation Research/DNA Repair* 435 (1): 89-101. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(99\)00039-7](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(99)00039-7).

- Wilson, David M., Masaru Takeshita, Arthur P. Grollman, et Bruce Demple. 1995. « Incision Activity of Human Apurinic Endonuclease (Ape) at Abasic Site Analogs in DNA (*) ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (27): 16 002-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.27.16002>.
- Wilson, Martin. 2017. « Introduction to Widefield Microscopy », juin. <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/introduction-to-widefield-microscopy/>.
- Wilson, Samuel H., et Thomas A. Kunkel. 2000. « Passing the Baton in Base Excision Repair ». *Nature Structural & Molecular Biology* 7 (3): 176-78. <https://doi.org/10.1038/73260>.
- Winter, Robert B., Otto G. Berg, et Peter H. Von Hippel. 1981. « Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 3. The Escherichia coli lac repressor-operator interaction: kinetic measurements and conclusions ». *Biochemistry* 20 (24): 6961-77. <https://doi.org/10.1021/bi00527a030>.
- Wyatt, Michael D., et Douglas L. Pittman. 2006. « Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks ». *Chemical research in toxicology* 19 (12): 1580-94. <https://doi.org/10.1021/tx060164e>.
- Yates, Christopher M., et Michael J. E. Sternberg. 2013. « The Effects of Non-Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms (NsSNPs) on Protein-Protein Interactions ». *Journal of Molecular Biology*, Understanding Molecular Effects of Naturally Occurring Genetic Differences, 425 (21): 3949-63. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.07.012>.
- Yue, Peng, Zhaolong Li, et John Moul. 2005. « Loss of Protein Structure Stability as a Major Causative Factor in Monogenic Disease ». *Journal of Molecular Biology* 353 (2): 459-73. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.020>.
- Yuste, Rafael. 2011. *Imaging: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zaja-Milatovic, Snjezana, et Ramesh C. Gupta. 2015. « Chapter 48 - Excitotoxicity, Oxidative Stress, and Neuronal Injury ». In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition)*, édité par Ramesh C. Gupta, 709-24. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800159-2.00048-8>.
- Zarebski, Miroslaw, Elzbieta Wiernasz, et Jurek W. Dobrucki. 2009. « Recruitment of Heterochromatin Protein 1 to DNA Repair Sites ». *Cytometry Part A* 75A (7): 619-25. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20734>.
- « ZEISS Microscopy Online Campus | Microscopy Basics | Image Formation ». s. d. Consulté le 18 juin 2022. <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/imageformation.html>.
- Zentout, Siham, Rebecca Smith, Marine Jacquier, et Sébastien Huet. 2021. « New Methodologies to Study DNA Repair Processes in Space and Time Within Living Cells ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (septembre): 730 998. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.730998>.
- Zhou, Xiaolong, Ziheng Zhuang, Wentao Wang, Lingfeng He, Huan Wu, Yan Cao, Feiyan Pan, et al. 2016. « OGG1 Is Essential in Oxidative Stress Induced DNA Demethylation ». *Cellular Signalling* 28 (9): 1163-71. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.05.021>.
- Zielinska, Agnieszka, Owain T. Davies, Rosalind A. Meldrum, et Nikolas J. Hodges. 2011. « Direct Visualization of Repair of Oxidative Damage by OGG1 in the Nuclei of Live Cells ». *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 25 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1002/jbt.20346>.

Zuchegna, Candida, Fabiana Aceto, Alessandra Bertoni, Antonella Romano, Bruno Perillo, Paolo Laccetti, Max E. Gottesman, Enrico V. Avvedimento, et Antonio Porcellini. 2014. « Mechanism of retinoic acid-induced transcription: histone code, DNA oxidation and formation of chromatin loops ». *Nucleic Acids Research* 42 (17): 11040-55. <https://doi.org/10.1093/nar/gku823>.

Annexes

- Smith, Rebecca, Théo Lebeauvin, Szilvia Juhász, Catherine Chapuis, Ostiane D'Augustin, Stéphanie Dutertre, Peter Burkovics, Christian Biertümpfel, Gyula Timinszky, et Sébastien Huet. 2019. « Poly(ADP-Ribose)-Dependent Chromatin Unfolding Facilitates the Association of DNA-Binding Proteins with DNA at Sites of Damage ». *Nucleic Acids Research* 47 (21): 11 250-67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz820>.
- D'Augustin, Ostiane, Sébastien Huet, Anna Campalans, et Juan Pablo Radicella. 2020. « Lost in the Crowd: How Does Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1 (OGG1) Find 8-Oxoguanine in the Genome? » *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): E8360. <https://doi.org/10.3390/ijms21218360>.
- Singh, Jenny Kaur, Rebecca Smith, Magdalena B. Rother, Anton J. L. de Groot, Wouter W. Wiegant, Kees Vreeken, Ostiane D'Augustin, et al. 2021. « Zinc Finger Protein ZNF384 Is an Adaptor of Ku to DNA during Classical Non-Homologous End-Joining ». *Nature Communications* 12 (1): 6560. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26691-0>.
- Lejart, Audrey, Siham Zentout, Catherine Chapuis, Ostiane D'Augustin, Rebecca Smith, Gilles Salbert, et Sébastien Huet. 2022. « The N-Terminal Domain of TET1 Promotes the Formation of Dense Chromatin Regions Refractory to Transcription ». *Chromosoma* 131 (1-2): 47-58. <https://doi.org/10.1007/s00412-022-00769-0>.

Poly(ADP-ribose)-dependent chromatin unfolding facilitates the association of DNA-binding proteins with DNA at sites of damage

Rebecca Smith^{1,†}, Théo Lebeau^{1,†}, Szilvia Juhász², Catherine Chapuis¹,
Ostiane D'Augustin¹, Stéphanie Dutertre³, Peter Burkovics⁴, Christian Biertümpfel⁵,
Gyula Timinszky^{2,*} and Sébastien Huet^{1,*}

¹Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de génétique et développement de Rennes) – UMR 6290, F- 35000 Rennes, France, ²MTA SZBK Lendület DNA damage and nuclear dynamics research group, Institute of Genetics, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, 6276 Szeged, Hungary, ³Univ Rennes, CNRS, Inserm, BIOSIT (Biologie, Santé, Innovation Technologique de Rennes) – UMS 3480, US 018, F-35000 Rennes, France, ⁴Laboratory of Replication and Genome Stability, Institute of Genetics, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, 6276 Szeged, Hungary and ⁵Department of Structural Cell Biology, Molecular Mechanisms of DNA Repair, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany

Received January 21, 2019; Revised September 01, 2019; Editorial Decision September 09, 2019

ABSTRACT

The addition of poly(ADP-ribose) (PAR) chains along the chromatin fiber due to PARP1 activity regulates the recruitment of multiple factors to sites of DNA damage. In this manuscript, we investigated how, besides direct binding to PAR, early chromatin unfolding events controlled by PAR signaling contribute to recruitment to DNA lesions. We observed that different DNA-binding, but not histone-binding, domains accumulate at damaged chromatin in a PAR-dependent manner, and that this recruitment correlates with their affinity for DNA. Our findings indicate that this recruitment is promoted by early PAR-dependent chromatin remodeling rather than direct interaction with PAR. Moreover, recruitment is not the consequence of reduced molecular crowding at unfolded damaged chromatin but instead originates from facilitated binding to more exposed DNA. These findings are further substantiated by the observation that PAR-dependent chromatin remodeling at DNA lesions underlies increased DNase hypersensitivity. Finally, the relevance of this new mode of PAR-dependent recruitment to DNA lesions is demonstrated by the observation that reducing the affinity for DNA of both CHD4 and HP1 α , two proteins shown to be involved in the DNA-damage response, strongly impairs their recruitment to DNA lesions.

INTRODUCTION

In eukaryotic cells, the tight packing of chromatin acts as a physical barrier, hindering the accessibility of the genomic material. This poses a challenge for DNA repair factors, which need to bind directly to DNA lesions in order to restore genomic integrity. As part of the DNA damage response (DDR), early chromatin remodeling events triggered by the activation of different pathways help ensure timely access of repair proteins to DNA lesions. Among these different pathways, poly(ADP-ribose) (PAR) signaling is one of the first to be activated upon DNA damage (1). PAR signaling relies on the activity of PAR polymerases and in particular, on the founding member of this family of enzymes, the protein PARP1 which recognizes and binds to DNA lesions leading to a dramatic increase of its catalytic activity (2,3). Activated PARP1 then catalyzes the formation of PAR chains on its target proteins, mainly PARP1 itself and histones (4), in the vicinity of the breaks. These PAR chains act as a binding platform for PAR-binding effector proteins including chromatin remodelers, such as ALC1 or CHD2 (5,6), and also modulate the activity of these effectors by allosteric regulation (7,8). The action of the remodelers combined with electrostatic repulsion between DNA and PAR chains decorating the chromatin fiber contribute to the rapid relaxation of the chromatin structure at DNA damage sites (9,10).

The most likely function of PAR-dependent chromatin unfolding is to increase the accessibility to DNA at the lesions. In line with this hypothesis, a study by Izhar *et al.*

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 2 23 23 45 57; Fax: +33 2 23 23 44 78; Email: sebastien.huet@univ-rennes1.fr
Correspondence may also be addressed to Gyula Timinszky. Tel: +36 62 599 600; Fax: +36 62 433 503; Email: timinszky.gyula@brc.mta.hu

[†]The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

showed that a number of transcription factors with no known role in DNA repair were recruited to sites of DNA damage in a PAR-dependent manner (11). However, this work did not discriminate between recruitment due to an affinity for PAR chains, a property reported for some DNA-binding proteins (12), or from increased local accessibility to chromatin as a result of relaxation. Recently, we also observed that early chromatin relaxation, and not direct PAR binding, was responsible for the PAR-dependent recruitment of some chromatin remodelers, namely CHD3 and CHD4 (13).

In the present study, we aimed to more precisely delineate the contribution of PAR-dependent chromatin remodeling mechanisms in modulating the accessibility of chromatin at sites of DNA damage. We show that PAR-signaling promotes the recruitment of DNA-binding but not histone-binding domains to DNA lesions. We attribute this recruitment to affinity for DNA rather than interaction with PAR chains. Furthermore, we find that the recruitment of DNA-binding domains to regions of relaxed damaged chromatin cannot be explained by a decrease of the macromolecular crowding conditions in this area but rather rely on an increase in the binding rates of the DNA-binding domains controlled by chromatin unfolding. Finally, we show that this mechanism of recruitment also holds true for CHD4 and HP1 α , two proteins known to be involved in DNA repair.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

Plasmids encoding YFP-macroH2A1.1 macrodomain (14), PATagRFP-H2B, GFP-WWE (from RNF146) (10), PARP1-mCherry (5), GFP nanobody-LacI fusion, iRFP670-ALC1(WT), iRFP670-ALC1(E175Q) (13), the FRET-crowding sensor (15), GFP-LANA-1-32 (16), pH3-paGFP (17), YFP-HMGN2-NBD (HMGN2- Δ C43) (18), GFP-5 (19), GFP-C/EBPalpha (20), paGFP-H2B (21) GFP-CHD4 (22), GFP-CHD4 (4A) (23), and GFP-ZF45 and GFP-ZF345 (24) have been previously described. Monomeric GFP was expressed from pmEGFP-N1. iRFP670-N1 (25) was digested with BamHI and NotI to release the coding sequence of iRFP670 which was ligated into reciprocal sites on pH2B-mCherry (26) to make pH2B-iRFP670. GFP-Sox5 and GFP-HMG (amino acid 556–624 of Sox5) were made using Gibson assembly (New England Biolabs) with pmEGFP-N1 and and 5'-GATCTCGAGCTCAAGCTTTCGAATTCATGTTACTGACCCTGATTTACCTC-3' and 5'-GGATCCCGGGCCCGCGGTACCTTGTTGGCTTG TCCCGCAATG-3', to amplify full-length Sox5 and 5'-GATCTCGAGCTCAAGCTTTCGAATTCATGTTA CTGACCCTGATTTACCTC-3' and 5'-GGATCCCGGG CCCGCGGTACCTTGTTGGCTTGTTCCCGCAATG-3' to amplify the HMG domain from CBIG-Sox5 variant 3, a gift from Jeffrey Macklis (Addgene plasmid # 48707). The BZIP domain from C/EBPa was cut from pEBG-BZIPa (gift from Dong-Er Zhang, Addgene plasmid # 12436 (27)) and ligated into pmEGFP-C1 using BspEI and EcoRI restriction sites on both plasmids, to obtain the construct GFP-BZIP. GFP-LZIP was made by amplifying LZIP from

BZIP using 5'-AATGAATTCACGCGCAGTTGCC-3' and 5'-TTATCCGGACTGACCAGTGACAATGACCG-3' and ligated into pmEGFP-C1 between BspEI and EcoRI restriction sites. GFP-HOXC10 and GFP-Homeo (amino acid 268–327 of HOXC10) was made using Gibson assembly with pmEGFP-N1 and pCMV-SPORT6-HOXC10 from the Mammalian Gene Collection (IMAGE ID 3458115) using 5'-GATCTCGAGCTCAA GCTTCGAATTCATGACATGCCCTCGCAATG-3' and 5' GGATCCCGGGCCCGCGGTACCTTG GTGAAATTAATAATTGGAGGTCAG-3' (for full-length HOXC10) and 5'-GATCTCGAGCTCAAGCTT CGAATTCATGGGAAGGAAGAAGAGGTGC-3' and 5'- GGATCCCGGGCCCGCGGTACCTTGTT CATTTCCTTGAGTTTCATTC-3' (for Homeo). The tandem ZF345 construct (GFP-(ZF345)²) was made using Gibson assembly with GFP-ZF345 (24) and ZF345 amplified using 5'-TGCCCTTCCCATGCC CTTCCCGGGCTGCGGGAAGATCTTTGC-3' and 5'-GGCAAAGATCTTCCCGCAGCCCGGGAAG GGCAAATCACTAGTGACCCTTGAGATTC-3'. To make GFP-CHD4 (W508E) and GFP-CHD4 (W644E), GFP-CHD4 was digested with BamHI to remove a 2.7 kb fragment and exchanged with the same region from pBluescript-CHD4 (W508E) or pBluescript-CHD4 (W644E) (28). HP1 α was amplified from cDNA using 5'-ATATAAGATCTGGAAAGAAAACCAAGCGGAC-3' and 5'-TATATAGAATTCAGCTCTTTGCTGTT TCTTTC-3' and ligated into pmEGFP-C1 between BglII and EcoRI restriction sites to make GFP-HP1 α . The chromodomain of HP1 α was amplified using 5'-CGCAGATCTGTGCGTGGAGAAGGTGCTAGAC-3' and 5'- AACCCGAATTCAGGGTTTATTATTTTCAC-3' and ligated into pmEGFP-C1 between BglII and EcoRI restriction sites to make GFP-HP1 α -Chromodomain. The N-terminal region of HP1 α was amplified using 5'- GCTGTACAAGTCCGGACTCAGATCTGGA AAGAAAACCAAGCGG-3' and 5'-CTGGTTCCAG TTTATTATTTTCACCCTCCTTCATC-3' and the C-terminal region of HP1 α was amplified using 5'-AAATAATAAACTGGAACCAGAAAAGATCATTG-3' and 5'-CGCGGTACCGTTCGACTGCAGAATT CTTAGCTCTTTGCTGTTTCTTTC-3'. These fragments, together with pmEGFP-C1, were used to make GFP-HP1 α - Δ hinge using Gibson assembly. The macrodomain of macroH2A1.1 was amplified using 5'-GGAGATCTCAGGGTGAAGTCAGTAA-3' and 5'-CCGGAATTCCTAGTTGGCGTCCAGCTT-3' and cloned into pmEGFP-C1 between BglII and EcoRI restriction sites to make pmEGFP-macroH2A1.1 macrodomain.

Cell culture, Hoechst presensitization, osmotic shocks and PARP inhibition

U2OS cells were cultured in DMEM (4.5 g/l glucose, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies), 2 mM glutamine (Sigma), 100 μ g/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin (Sigma) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. For transient expression of plasmids, cells were transfected 12–24 h after seeding into eight-well Lab-Tek II chambered coverglass (Thermo

Scientific) with XtremeGENE HP (Sigma) or Xfect (Clontech) according to the manufacturer's instructions and incubated for 48 h prior to imaging. For Hoechst presentization, growth medium was aspirated from the Lab-Tek and replaced with fresh medium containing 0.3 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 for 1 h at 37°C. Immediately prior to imaging, growth medium was replaced with CO₂-independent imaging medium (Phenol Red-free Leibovitz's L-15 medium (Life Technologies) supplemented with 20% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 $\mu\text{g/ml}$ penicillin and 100 U/ml streptomycin). For hypotonic treatment, the imaging medium was replaced with distilled water 10 min prior to imaging. For hypertonic treatment, cells were bathed with imaging medium supplemented by 160 mM sucrose 5 min prior to imaging (29). For PARP inhibition, cells were treated with 30 μM AG14361 (Euromedex) for 30 min prior to imaging. All experiments were completed with unsynchronized cells.

Confocal imaging and laser microirradiation

Live-cell imaging experiments were completed on a Ti-E inverted microscope from Nikon equipped with a CSU-X1 spinning-disk head from Yokogawa, a Plan APO 60 \times /1.4 NA oil-immersion objective lens and a sCMOS ORCA Flash 4.0 camera. The fluorescence of EGFP and the activated form of PATagRFP were excited with lasers at 490 and 561 nm, respectively. For fluorescence detection, we used bandpass filters adapted to the fluorophore emission spectra. Laser microirradiation and local photoactivation at 405 nm was performed along a 16 μm -line through the nucleus using a single-point scanning head (iLas2 from Roper Scientific) coupled to the epifluorescence backboard of the microscope. To ensure reproducibility laser power at 405 nm was measured at the beginning of each experiment and set to 125 μW at the sample level. Cells were maintained at 37°C with a heating chamber.

Fluorescence correlation spectroscopy

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) experiments were performed on a Leica SP8 or a Zeiss LSM880 confocal setup. The Leica system was equipped with a Plan APO 63 \times /1.2 NA water immersion objective. GFP fluorescence was excited with a 488 nm laser and single emitted photons, selected by a bandpass filter at 500–550 nm, were detected and counted using a single photon avalanche photodiode and a PicoHarp module from PicoQuant. On the Zeiss system, a C-Apo 40 \times /1.2 NA water immersion objective was used. GFP fluorescence was excited with a 488 nm laser and single emitted photons at wavelength ranging between 500 and 550 nm were detected and counted on the GaAsP spectral detector. On both systems, laser power used for FCS measurements were adjusted to minimize photobleaching and avoid the induction of photodamage in Hoechst-sensitized cells. Each FCS acquisition lasted 30–45 s to reduce the noise in the autocorrelation curves. For each nucleus, FCS acquisitions were performed before and \sim 1–2 min after damage induction. The power of the 405 nm laser used for microirradiation was set to 160 μW at the sample level. Irradiation was performed within nuclear regions of

20 \times 1 μm (Leica SP8) or 12 \times 2 μm (Zeiss LSM880). Cells were maintained at 37°C with a heating chamber. Raw photon traces obtained for GFP-tagged DNA-binding domains were detrended for slow fluctuations using the Fluctuation Analyzer 4G software (30).

Fluorescence lifetime imaging

Fluorescence lifetime imaging (FLIM) experiments were performed on a Leica SP8 confocal setup equipped with a Plan APO 63 \times /1.4 NA oil immersion objective. CFP fluorescence was excited with a pulsed 440 nm laser and emitted photons were selected by a bandpass filter at 467–499 nm. Time-correlated photon counting images were acquired using a single photon avalanche photodiode and a PicoHarp module from PicoQuant. After manual segmentation of the irradiated area on the acquired images, fluorescence lifetimes were estimated by fitting the fluorescence decay curves with a single-exponential decay model using the Symphotime software (PicoQuant). For each nucleus, FLIM acquisitions were performed before and \sim 120 s after damage induction. The power of the 405 nm laser used for microirradiation was set to 160 μW at the sample level and irradiation was performed within nuclear regions of 20 \times 1 μm . Cells were maintained at 37°C with a heating chamber.

Quantification of protein recruitment and changes in chromatin compaction

We used an assay described previously by Lebeaupin *et al.* to quantify recruitment kinetics and chromatin relaxation at DNA damage sites (31). Briefly, we used U2OS cells co-expressing the protein of interest tagged with GFP together with core histone H2B tagged with the photoactivatable fluorescent protein PATagRFP. Irradiation at 405 nm along a line of 16 μm through Hoechst-sensitized nuclei allowed simultaneously infliction of DNA damage and photoactivation of PATagRFP to highlight the damaged area. Using a custom MATLAB routine, this highlighted area was segmented automatically and the segmentation mask was applied to the image of the GFP channel to quantify protein accumulation at sites of DNA damage. The mask of the damaged chromatin area was also fitted with an ellipsoid and its minor axis length was used to measure the thickness of the damaged line area. By calculating the ratio between this thickness at a given time point and the thickness immediately post-microirradiation, we could then assess changes in the chromatin compaction state at DNA damage sites.

To measure change in chromatin compaction upon hypertonic treatment, we acquired 3D stacks of the nuclei before and after addition of the hypertonic medium and performed automatic 3D thresholding to estimate the volume of the photoactivated chromatin region.

Fitting of the FCS curves

FCS correlation curves were fitted either with an effective diffusion or a reaction dominant model (32). The effective diffusion model is as follows:

$$G(t) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left(1 + \frac{t}{\tau_{\text{res}}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\omega^2 \tau_{\text{res}}}\right)^{-1/2} \quad (1)$$

where N is the number of tagged molecules in the focal volume, τ_{res} is the residence time in the focal volume, and ω is the structural parameter of the focal volume, which was fixed to 6. For the fluorescently tagged DNA-binding motifs assessed below, we assumed that the increase in residence time compared to purely diffusible GFP could be attributed mainly to binding to chromatin rather than a change in the gyration radius. Under this assumption, according to (32), one can estimate:

$$\frac{k'_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \left(\frac{\tau_{\text{res}}}{\tau_{\text{GFP}}} \right) - 1 \quad (2)$$

where k'_{on} is the pseudo first-order association rate with chromatin, k_{off} is the dissociation rate and τ_{GFP} is the residence time in the focal volume measured for GFP. The values of the $\frac{k'_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}$ ratio post-irradiation were corrected as follows for changes in chromatin concentration compared to the pre-damage conditions. Cells expressing H2B-PATagRFP were irradiated at 405 nm with the same settings as the ones used for the FCS acquisitions and the area of the photoactivated damaged chromatin region was measured by automatic segmentation immediately after irradiation ($A(0)$) and 60 s post-irradiation ($A(60)$). The corrected $\frac{k'_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}$ ratio was then calculated as:

$$\frac{k'_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \frac{k'_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} (\text{fit}) \left(\frac{A(60)}{A(0)} \right) \quad (3)$$

with $\frac{k'_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} (\text{fit})$ the value obtained from the fit.

When using the reaction-dominant model, the correlation curves were first normalized as follows: $G_{\text{norm}}(t) = \frac{G(t)}{G(0)}$ with $G(0)$ calculated as the mean of the correlation curve for times ranging between 10 and 90 μs .

The expression of the reaction-dominant model is then given by:

$$G_{\text{norm}}(t) = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{off}} + k'_{\text{on}}} \left(1 + \frac{t}{\tau_{\text{diff}}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\omega^2 \tau_{\text{diff}}} \right)^{-1/2} + \frac{k'_{\text{on}}}{k_{\text{off}} + k'_{\text{on}}} e^{-k_{\text{off}} t} \quad (4)$$

where τ_{diff} is the diffusion time in the focal volume, ω is the structural parameter of the focal volume, which was fixed to 6, k'_{on} is the pseudo first-order association rate with chromatin and k_{off} is the dissociation rate. The correlation curves obtained pre- and post-irradiation for a given nucleus were fitted together. Since diffusion is not affected by chromatin remodeling at DNA damage sites (see Results), the parameter τ_{diff} was shared for the fits pre- and post-irradiation. Similar to the $\frac{k'_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}$ ratio, the values of the association rate post-irradiation were corrected for changes in chromatin concentration compared to the pre-damage conditions according to:

$$k'_{\text{on}} = k'_{\text{on}} (\text{fit}) \left(\frac{A(60)}{A(0)} \right) \quad (5)$$

with $k'_{\text{on}}(\text{fit})$ the value obtained from the fit.

Micropore irradiation assay

A modified protocol previously described by Suzuki *et al.* was established to quantify PARylation induced chromatin relaxation at sites of microirradiation (33). U2OS cells were cultured as described above and labeled with 50 μM 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Sigma) for 24 h followed by 1 h treatment with 10 μM Olaparib (Selleckchem) or were left untreated prior to UV irradiation. For UV irradiation, the medium was removed and the cells were covered with polycarbonate membranes with a 5 μm pore size (Millipore) and exposed to 100 J/m^2 of UVC light. After UV irradiation, fresh cell medium was added to the cells and the polycarbonate membrane was removed. Cells were fixed with 3% PFA at different time points post-irradiation, washed with 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 min and then treated with 0.005 $\text{U}/\mu\text{l}$ DNase I (Thermo Fisher Scientific) for 5 min. The digested DNA ends were labeled with 200 μM 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU; Sigma) by terminal deoxynucleotidyl transferase (Thermo Fisher Scientific) for 2 h. Cells were immunostained with anti-IdU (Abcam, ab187742 at 1:100) or anti-poly-ADPr (10H, ascites at 1:300) and anti- γH2AX (Abcam, ab81299 at 1:2000) antibodies and counterstained with Hoechst. Primary antibodies were detected using Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen, A21422 at 1:1000) and Alexa Fluor 555 conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, A21428 at 1:1000). z-stacks of images were acquired using a Visitron spinning disk confocal system (Visitron systems GmbH) equipped with Yokogawa CSU-W1 spinning disk unit, Olympus IX83 inverted microscope (60 \times oil objective, NA 1.42), Andor Zyla 4.2 Plus camera, with 405, 488 and 561 nm lasers. The raw images were analyzed in CellProfiler (34) after generating the maximum intensity projections of the z-stacks in Fiji (35). In CellProfiler, the Hoechst stained DNA was used to segment the nuclei and the γH2AX signal was used to identify the irradiated areas. The average signal intensity of the background-subtracted IdU channel was measured in the identified nuclei and irradiated areas. The signal intensities in the irradiated areas were divided by the signal intensities of the corresponding nuclei and plotted using Prism.

Statistics

For the recruitment and chromatin relaxation curves, means \pm SEM are shown. For the FCS correlation curves, mean curves are shown. Boxplots were generated using a web-tool developed by the Tyers and Rappsilber labs (<http://boxplot.tyerslab.com/>). The box limits correspond to the 25th and 75th percentiles and the bold line indicates the median value. The whiskers extend 1.5 times the interquartile range and outliers are shown by dots. Mean curves as well as boxplots were obtained from measurements in at least 15 individual nuclei for each condition. P values were calculated using two-sided unpaired Student's t -test assuming unequal variances except for comparing measurements performed in the same nuclei before and after irradiation, for which two-sided paired Student's t -test assuming unequal variances were used. On the boxplots, * refers to $P < 0.05$, ** to $P < 0.01$, *** to $P < 0.001$, **** to $P < 0.0001$ and n.s. to non significant.

RESULTS

DNA-binding but not histone-binding domains are recruited to sites of DNA damage in a PAR-dependent manner

The most basic, repeating unit of chromatin is composed of two main components, the DNA double-helix and histone octamers, together forming the nucleosome core-particle (36). To assess whether the local changes in chromatin structure regulated by PAR signaling upon DNA damage could modulate the accessibility to either DNA or histones, we analyzed the behavior of different DNA- and histone-binding domains at sites of DNA damage.

We chose to study three different DNA-binding domains: the HMG domain from SOX5, the BZIP domain from C/EBPa and the Homeobox (Homeo) domain from HOXC10 (27,37,38). These transcription factors have no reported role in the DDR thus their DNA-binding domains are not expected to show specificity for DNA lesions. Here, as well as throughout all this work, we induced DNA damage by microirradiating Hoechst-sensitized nuclei of U2OS cells with a continuous laser at 405 nm. To quantitatively assess the level of DNA-binding domain recruitment to sites of damage over time, the GFP-tagged DNA-binding domains were co-expressed with core histone H2B fused to the photoactivatable protein PAtagRFP (Figure 1A and Supplementary Figure S1A). The mask of the microirradiated line highlighted by the photoconverted PAtagRFP was used both (i) to measure the accumulation of the GFP-tagged DNA-binding domain at DNA lesions and (ii) to assess changes in the chromatin compaction state at the DNA damage sites by measuring the thickness of the mask over time (31). Using this assay, we found that all the tested DNA-binding domains were recruited to sites of DNA damage with kinetics closely matching the ones characterizing chromatin relaxation (Figure 1B and Supplementary Figure S1A).

Next, cells were treated with a PARP inhibitor (PARPi) to block PAR-signaling (Supplementary Figure S1B). In agreement with previous findings (10), we observed that PARPi treatment not only fully abolished chromatin relaxation but even induced a slight over-compaction of the chromatin structure at DNA lesions (Figure 1B). Regarding recruitment, we observed that the stronger the accumulation of DNA-binding domains at DNA lesions, the less PAR-dependent this accumulation was. Indeed, while the weak recruitment of the HMG domain was fully suppressed upon PARPi treatment, the moderate accumulation of the BZIP domain was only partially abolished and the strong recruitment of the Homeo domain appeared to be independent of PARylation (Figure 1C). This PAR-dependent recruitment of DNA binding motifs at DNA lesions was observed not only upon PARPi treatment but also in cells lacking PARP1 (Supplementary Figure S1C–E). Moreover, we observed that full-length SOX5, C/EBPa and HOXC10 accumulated to irradiated areas similarly to the isolated DNA-binding domains indicating that these domains are sufficient to recapitulate the behavior of the full-length proteins in terms of recruitment to DNA lesions (Supplementary Figure S1F).

A plausible explanation of the differences in the levels of DNA-binding domains recruited to sites of DNA damage is that their recruitment is dependent on their affinity for DNA. In agreement with this hypothesis, we found that removing the DNA-binding stretch of BZIP to only keep the leucine-zipper area (LZIP) abolished recruitment to sites of DNA damage (Supplementary Figure S1G). Furthermore, we correlated DNA affinity of each DNA-binding domain with their level of accumulation at DNA lesions. To semi-quantitatively assess the binding affinity of the chosen DNA-binding domains directly in living nuclei in the absence of DNA damage, we measured the residence time of each DNA-binding domain within the focal volume of the confocal microscope by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and normalized it to the residence time measured for GFP (Supplementary Figure S1H and I). Since each of these GFP-tagged DNA-binding domains have relatively similar molecular weights and given that diffusion only varies as the cube root of the molecular weight, we assumed that a larger relative residency time, corresponding to slower mobility, was mostly due to stronger binding to undamaged DNA. We found a clear correlation between the level of recruitment of the DNA-binding domain at DNA lesions and relative residence time, indicating higher levels of recruitment for stronger DNA binding motifs (Figure 1D).

Finally, we assessed potential changes in the accessibility of the histone octamer upon DNA damage. Similar to the rationale behind the choice of the DNA-binding domains, we analyzed nucleosome accessibility by monitoring the recruitment of three histone-binding domains with no reported roles in the DDR. Neither the N-terminal domain of the Latency-Associated Nuclear Antigen (LANA-1–32) nor the nucleosome-binding domain of HMGN2 (HMGN2-NBD), which both bind to the folded domain of H2A-H2B (16,39), recruited to DNA lesions (Figure 1E and F). In fact, we even observed a slight eviction of these two domains from the damaged area which may originate from the local dilution of nucleosome concentration due to chromatin relaxation. HMGN2-NBD reportedly also binds DNA at the entry/exit site of the nucleosome, although with a much weaker affinity than for the H2A-H2B dimer (39). However, this weak DNA affinity does not appear sufficient to promote recruitment of HMGN2-NBD at DNA damage sites. We also monitored the recruitment of the chromodomain of HP1 α (HP1 α -CD) which recognizes the tail of histone H3 when it is trimethylated on lysine 9, a post-transcriptional modification that has not been reported to be involved in early steps of the DDR. Similar to the domains binding to the folded nucleosome core, we did not observe any accumulation of HP1 α -CD to sites of DNA-damage (Figure 1G), in line with what has been reported for the chromodomain of HP1 β (40).

Altogether, these data show that an affinity for DNA, but not for histones, promotes recruitment of proteins to DNA lesions. Significantly, PAR-signaling appears to be required for the recruitment of weak DNA-binding domains while being dispensable for stronger ones.

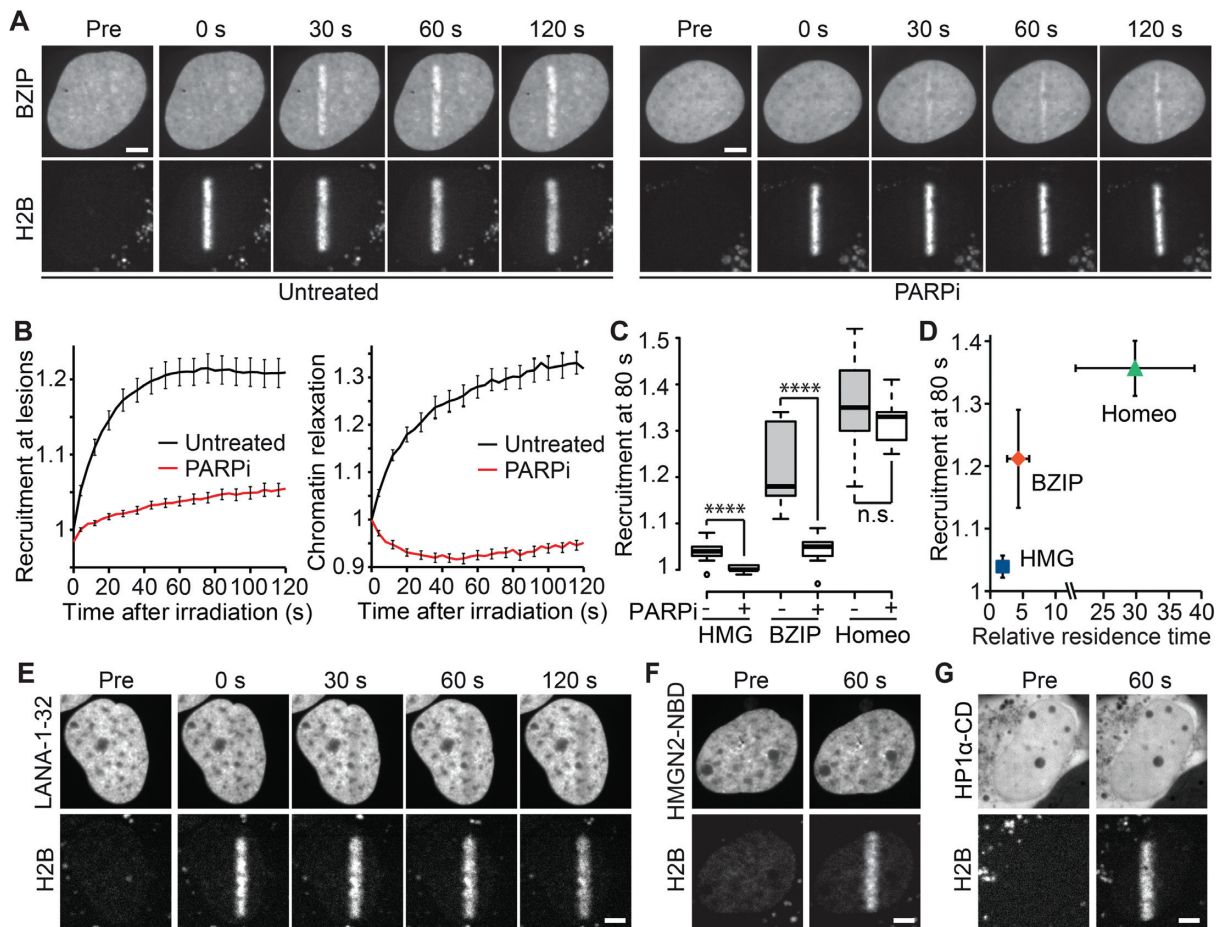


Figure 1. DNA-binding but not histone-binding domains are recruited to sites of DNA damage in a PAR-dependent manner. (A) Recruitment of the DNA-binding domain BZIP from C/EBP α tagged with GFP to sites of DNA damage induced by laser microirradiation. In addition to BZIP-GFP, cells expressed the core histone H2B tagged with the photoactivatable PATagRFP, which allowed highlighting of the irradiated area. Cells were left untreated or treated with 30 μ M of the PARP inhibitor AG14361 (PARPi). (B) Automatic segmentation of the photoconverted chromatin area by image analysis allowed quantitative measurement of BZIP recruitment kinetics at DNA damage sites (left) and the assessment of chromatin relaxation in this area (right). (C) Recruitment intensity of GFP-tagged DNA-binding domains at sites of DNA damage in the presence or absence of PARP inhibitor (PARPi) measured 80 s after DNA damage induction. (D) Recruitment intensity of GFP-tagged DNA-binding domains at sites of DNA damage 80 s after damage induction plotted against their relative residence time as measured by FCS. (E–G) Absence of recruitment to sites of DNA damage of (E) the N-terminal (1–32) histone-binding domain of LANA, (F) the nucleosome-binding domain (NBD) of HMGN2 and (G) the chromodomain (CD) of HP1 α . Photoactivated H2B-PATagRFP indicate regions of damage. Scale bars = 4 μ m.

PAR-independent recruitment of DNA-binding domains to sites of DNA damage correlates with a high affinity for DNA

To further investigate the impact of the affinity for DNA on PAR-dependent recruitment to sites of DNA damage, we analyzed the behavior of different combinations of the zinc-finger domains 3–5 from the transcription factor ZIC3 (24). Similar to the DNA-binding domains studied in the previous section, these zinc-finger domains have no reported specificity for DNA lesions and ZIC3 has not been shown to be part of the DDR. First, we compared two GFP-tagged constructs comprising two (ZF45) or three (ZF345) zinc-finger domains. This three zinc-finger construct showed a higher affinity for DNA than ZF45 when comparing their relative residence times measured by FCS (Figure 2A). Correlating with this difference in DNA affinity, ZF345 recruited to sites of DNA damage at higher levels compared to ZF45 (Figure 2B,C).

To assess the impact of further increasing binding affinity to DNA, we compared ZF345 with a tandem repeat of the three zinc-finger domains referred to as (ZF345)². As expected, (ZF345)² showed higher affinity for DNA and displayed higher levels of recruitment to DNA lesions than ZF345 (Figure 2D–F). Importantly, we also observed that, while the accumulation of ZF345 to sites of DNA damage relied on PAR-signaling, (ZF345)² was recruited to sites of damage in a PAR-independent manner (Figure 2F).

These observations fully corroborate our observations with the different classes of DNA-binding domains, indicating that the affinity for DNA is the major factor controlling the accumulation of DNA-binding domains at sites of DNA damage and that, above a certain level of affinity, PARylation becomes dispensable for recruitment.

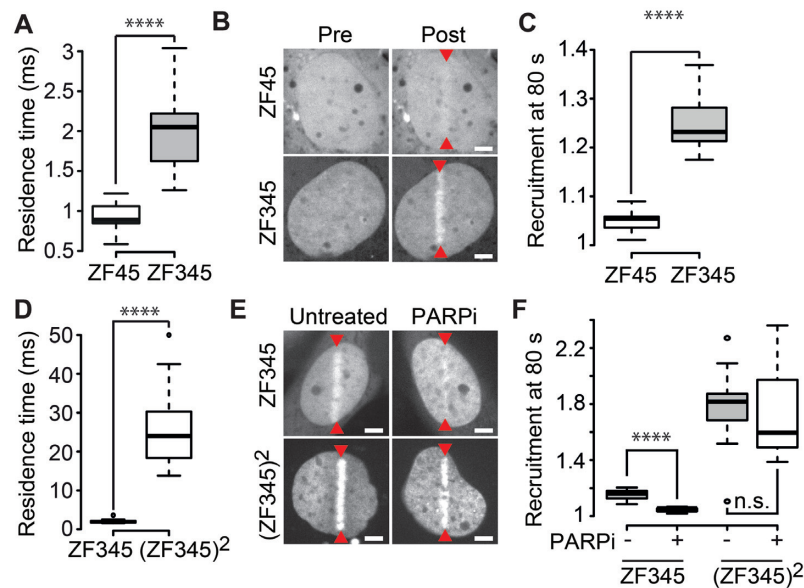


Figure 2. PAR-independent recruitment of DNA-binding domains to sites of DNA damage correlates with a high affinity for DNA. (A) Residence time measured by FCS for GFP-tagged zinc-finger domains 4 and 5 (ZF45) or 3, 4 and 5 (ZF345) of ZIC3. (B) Localization of GFP-ZF45 and GFP-ZF345 before (Pre) and 80 s after (Post) DNA damage induced by laser microirradiation (red arrowheads). (C) Recruitment intensity of GFP-ZF45 and GFP-ZF345 in the irradiated area measured 80 s after DNA damage induction. (D) Residence time for GFP-ZF345 and the tandem repeat of the three zinc-finger domains ((ZF345)²) tagged with GFP as determined by FCS. (E) Localization of GFP-ZF345 and GFP-(ZF345)² 80 s after DNA damage induced by laser microirradiation in untreated cells or cells treated with PARP inhibitor (PARPi). (F) Recruitment intensity of GFP-ZF345 and GFP-(ZF345)² in the irradiated area measured 80 s after DNA damage induction in untreated cells or cells treated with PARP inhibitor (PARPi). Scale bars = 4 μ m.

Recruitment of DNA-binding domains to DNA lesions is not triggered through direct PAR binding but rather relies on PAR-dependent chromatin unfolding

PARylation triggers two main events at sites of DNA damage: the recruitment of PAR-binding effector proteins and chromatin relaxation. Since certain DNA-binding domains of some repair proteins have been shown to bind PAR (12), it is possible that the PAR-dependent recruitment to sites of DNA damage we observed for the different DNA-binding domains presented above occurs through direct binding of PAR chains.

To test for this possibility, we first assessed the ability of the different DNA-binding domains to bind DNA and PAR *in vitro*. By gel shift assays, we could confirm that the four DNA-binding domains are able to bind DNA in contrast to the macrodomain of macroH2A1.1, which is a well-known PAR binder (41) (Supplementary Figure S2A). Next, we performed an *in vitro* PAR binding assay and saw that the four DNA-binding domains are able to bind PAR chains (Supplementary Figure S2B). This ability of the DNA-binding domains to bind PAR was still observed under denaturing conditions in contrast to the macrodomain of macroH2A1.1.

Despite the *in vitro* data showing interactions with PAR chains, the observation that the normalized recruitment kinetics of the different DNA-binding domains to the irradiation area are much slower than the ones of well-known PAR binders such as the WWE domain of RNF146 (42) or the macrodomain of macroH2A1.1 (Figure 3A) prompted us to question the involvement of direct PAR-binding in the accumulation of the DNA-binding domains at sites of damage. To further assess PAR binding in living cells, we used

a PAR-3H assay recently developed in our lab (13). Briefly, GFP-tagged proteins of interest are tethered to the LacO array using a LacI-GFP nanobody fusion and co-expressed with mCherry-PARP1 (Supplementary Figure S2C). Upon DNA damage, PARP1 is rapidly PARylated at the site of damage that facilitates its release from the damaged DNA and diffusion through the nucleus in a PARylated state (13,43). If the GFP-tagged tethered protein is able to bind PAR, such as the macrodomain of macroH2A1.1, PARylated PARP1 enriches at the LacO array (Supplementary Figure S2D). Using this assay, we show that the HMG, BZIP or ZF345 domains, all of which show PAR-dependent recruitment to sites of DNA damage, were unable to recruit PARylated PARP1 (Figure 3B and Supplementary Figure S2E and F). Nevertheless, one could still argue that the PAR chains found in the vicinity of the sites of damage are different in terms of quality and quantity from the ones present on PARP1 released from the lesions, and, as such, are able to trigger the recruitment of the DNA-binding domains by direct interaction.

We therefore used a second independent assay to more directly analyze the involvement of the interactions with PAR chains localized at the sites of damage in the recruitment of the DNA-binding domains. Cells were irradiated and, 60 s post-irradiation, i.e. after the completion of the PAR-dependent chromatin relaxation process, we added PARPi to acutely block PARP1 enzymatic activity. Under these conditions, the WWE domain of RNF146 was rapidly released from the irradiated area and, 360 s post-irradiation, the accumulation of WWE from the lesions was nearly completely reversed (Figure 3C), due to the rapid degradation of PAR by the sustained PAR glycohydrolase activity. In

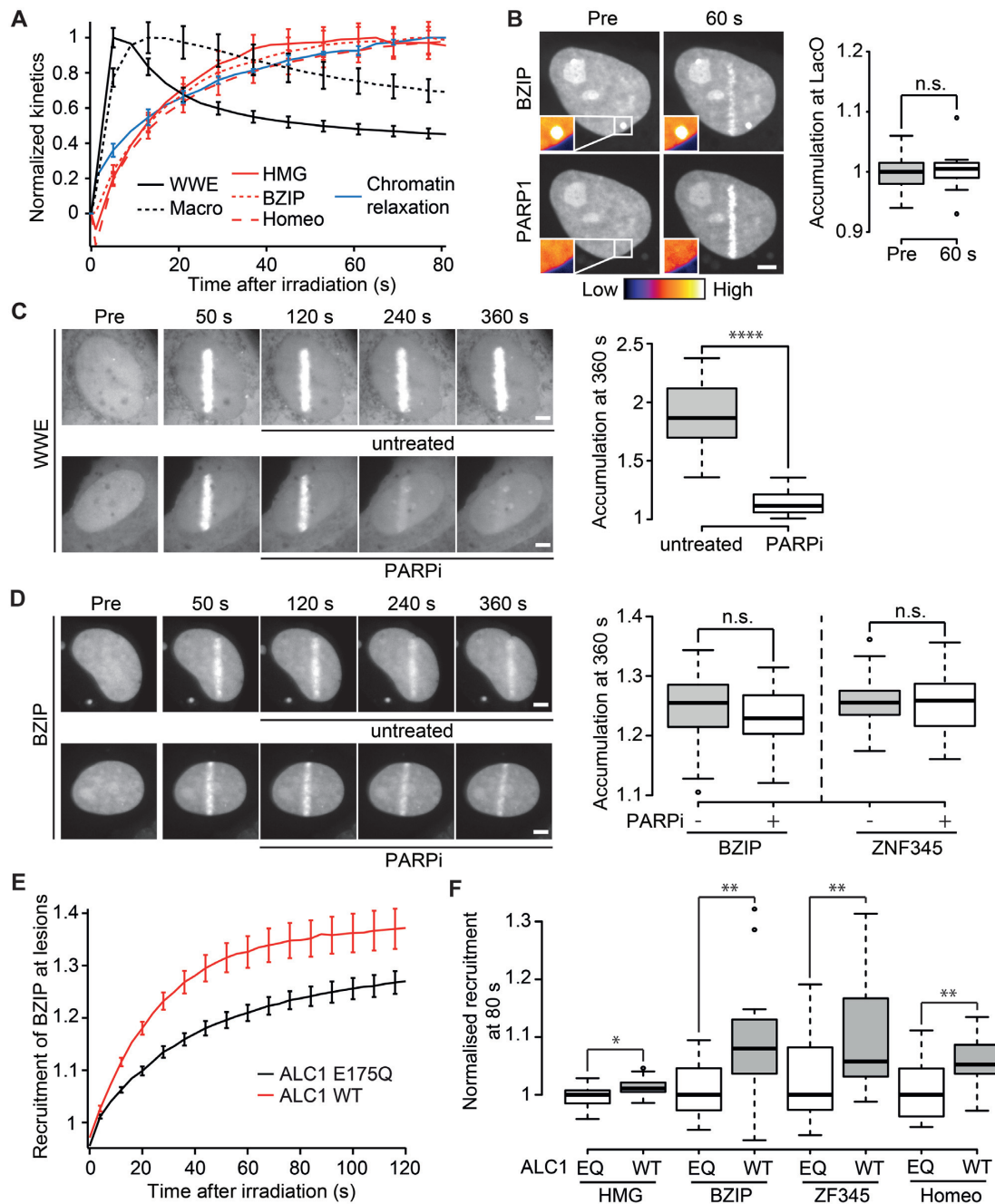


Figure 3. Recruitment of DNA-binding domains to sites of DNA damage is not triggered by PAR-binding. (A) Normalized recruitment kinetics of PAR binding domains GFP-WWE and YFP-macroH2A1.1 macrodomain (black) and DNA-binding domains GFP-BZIP, GFP-HMG and GFP-Homeo (red) in addition to normalized chromatin relaxation kinetics (blue). (B) GFP-BZIP tethered to the LacO array is unable to recruit PARylated mCherry-PARP1 after DNA damage induction. Insets, pseudocolored according to the look-up table displayed below panel B, show magnification of the LacO array. Boxplots show mCherry-PARP1 intensity at the LacO array quantified pre- and 60 s post-damage. The average intensity at the spot is corrected for background and normalized to average intensity of the nucleus. (C, D) Confocal images showing accumulation of GFP-WWE (C) or GFP-BZIP (D) at sites of DNA damage. Cells were left untreated or treated with PARPi 60 s after DNA damage induction. Boxplots show levels of GFP-WWE, GFP-BZIP or ZF345 accumulation at sites of damage 360 s after microirradiation. (E) Recruitment of the GFP-BZIP to sites of DNA damage induced by laser microirradiation in cells overexpressing WT ALC1 (red) or ATPase dead ALC1 (E175Q, black). (F) Recruitment intensity of GFP-tagged DNA-binding domains at sites of DNA damage in cells overexpressing WT ALC1 or ATPase dead ALC1 (E175Q) measured 80 s after DNA damage induction. For each domain, the recruitment has been normalized to the median recruitment in the E175Q expressing cells. Scale bars = 4 μ m

contrast, PARPi treatment did not revert the accumulation of BZIP and ZF345 at the irradiation area (Figure 3D). HMG was already released from the DNA lesions at 360 s post-irradiation in the absence of PARPi. Consequently, for this domain, we tested the effect of PARPi treatment over a shorter time frame. At 180 s post-irradiation, we observed no impact of the addition of PARPi on HMG accumulation at sites of damage while WWE was already partially released compared to the control conditions (Supplementary Figure S2G). These results, together with the ones obtained with the PAR-3H assay, argue against the involvement of direct interactions between the DNA-binding domains and PAR chains during the recruitment of these domains to DNA lesions.

In lieu of direct binding to PAR chains, the accumulation of the DNA-binding domains to sites of damage may be promoted by the rapid PAR-dependent unfolding of the chromatin. To assess this possibility, we analyzed the impact of modulating the chromatin relaxation process on the recruitment of the DNA-binding domains. In agreement with our previous results (10,13), we confirmed that chromatin relaxation was enhanced in cells overexpressing the chromatin remodeler ALC1 compared to those overexpressing its catalytically inactive mutant (Supplementary Figure S2H). We found that the four DNA-binding domains, but not the PAR binding macrodomain of macroH2A1.1, displayed enhanced recruitment to DNA lesions in cells overexpressing wild-type ALC1 (Figure 3E, F and Supplementary Figure S2I). This was even true for Homeo, for which the recruitment to DNA lesions did not appear to be PAR-dependent in normal conditions (Figure 1C).

Based on the different assays presented in this section, it is unlikely that the recruitment of the DNA-binding domains to DNA lesions rely on direct interactions with PAR chains. Instead, recruitment appears promoted by the early chromatin remodeling processes occurring upon damage.

Recruitment of DNA-binding domains to relaxed damaged chromatin cannot be attributed to reduced molecular crowding conditions

Chromatin is the major crowding agent in the nucleus and its compaction state modulates diffusion-reaction kinetics of DNA-binding proteins within the nucleus (19). Given the similarities between the kinetics of the recruitment of DNA-binding domains and chromatin relaxation at sites of DNA damage, it is possible that PAR-dependent chromatin relaxation leads to reduced crowding conditions at DNA lesions, thus facilitating the accumulation of DNA-binding domains in this area.

Crowding affects diffusion-reaction dynamics in three different ways: (i) it leads to volume exclusion since the volume occupied by the background molecules, in this case the chromatin, is not accessible to diffusible proteins, (ii) it hinders diffusion, and (iii) it favors compact molecular conformations which, in the case of a protein complex, shifts the binding equilibrium towards the bound state (44). These three consequences of crowding are observed in dense chromatin areas (19) and can be reversed by relaxing chromatin via hypotonic treatment which leads to global nuclear swelling (29). In the following experiments, we quantita-

tively assessed crowding conditions at sites of DNA damage to distinguish between two alternative scenarios (Supplementary Figure S3): (Model 1) PAR-dependent chromatin unfolding leads to a local increase of the accessible volume fraction and thus, reduced crowding conditions or (Model 2) PAR-dependent chromatin unfolding occurs concomitantly to fiber ‘swelling’, potentially due to the addition of a large number of PAR chains, which keeps the level of crowding unchanged at sites of DNA damage.

We first assessed volume exclusion by measuring the concentration of diffusible probes in and out the damaged area after chromatin relaxation. If chromatin relaxation at sites of DNA damage leads to reduced crowding, it is expected that a higher proportion of the volume is accessible to a diffusible tracer within the relaxed chromatin area compared to the undamaged region, leading to a local increase in the concentration of this tracer (Supplementary Figure S3, Model 1). We observed an increase in the concentration of monomeric GFP in the DNA-damage sites, which allowed us to estimate a local change in accessible volume (Figure 4A,B). The increase in accessible volume measured for GFP was nevertheless modest compared to the change in the volume of the irradiated area, measured by the size of the photoactivated H2B area (Figure 4A and B). In PARPi treated cells, no local increase of GFP concentration was observed in the damaged area, showing that the slight change in accessible volume observed in untreated cells was the consequence of PAR-dependent chromatin remodeling at DNA lesions (Figure 4C). This first experiment suggests a slight reduction in the volume exclusion effect at relaxed damaged chromatin, indicative of decreased crowding conditions compared to undamaged chromatin. To confirm this finding, we also measured changes in volume exclusion for a larger diffusible probe—a GFP pentamer (GFP-5)—which are more sensitive to changes in molecular crowding (45). However, no change in accessible volume at the site of DNA damage was observed for GFP-5 suggesting that this larger probe, in contrast to a single GFP, does not experience reduced molecular crowding in this area (Figure 4C). It is worth noting that the molecular size of many of the repair complexes more closely matches that of GFP-5 rather than a single GFP molecule.

Decreasing crowding should also reduce diffusion hindrance. However, using FCS, we observed no change in the residence time of GFP or GFP-5 before and after DNA damage (Figure 4D and E). The absence of an effect on diffusion hindrance could be explained by a poor sensitivity of the assay. To test this possibility, we induced chromatin over-compaction by bathing cells with hypertonic medium (29) and then triggered relaxation of the over-condensed chromatin by inflicting DNA damage by laser irradiation (10). We estimated that, after this unfolding process, the chromatin compaction state in the irradiated area was similar that in the isotonic medium (Supplementary Figure S4A–C). We assessed the diffusion speed of GFP by FCS in nuclei in isotonic medium, after hypertonic treatment and ~60 s after laser irradiation. In agreement with enhanced crowding conditions (29), we observed an increase of the residence time of GFP upon hypertonic treatment (Supplementary Figure S4D). In contrast, relaxation of the hyper-compacted chromatin in response to DNA damage had no

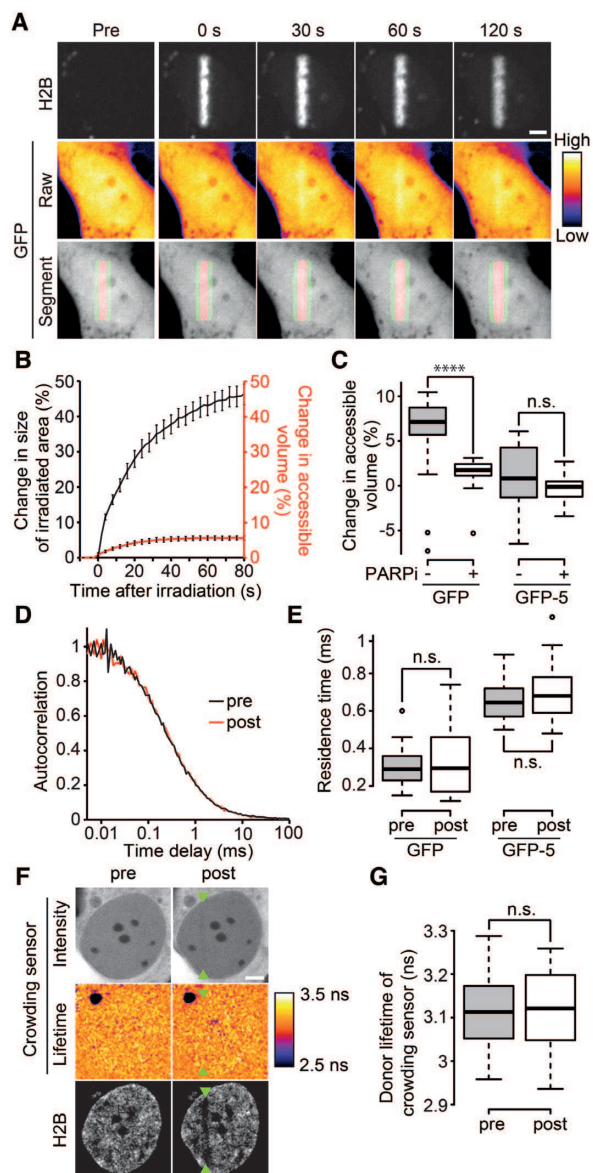


Figure 4. PAR-dependent chromatin relaxation does not reduce macromolecular crowding at DNA damage sites. (A) Raw images to assess changes in volume exclusion at DNA damage sites for freely diffusible GFP. Cells co-express GFP and H2B-PATagRFP. The volume of the damaged area is determined by measuring the area of photoconverted chromatin area. The segmentation of this area is also used as a mask to measure GFP intensities inside (Red area in segment panel) and outside (Green area in segment panel) the irradiated area, whose ratio is used to determine changes in accessible volume for this probe. Raw GFP images are pseudocolored according to the look-up table displayed on the right of panel A. (B) Quantification of changes in size of irradiated area (Black) and changes in accessible volume for GFP (Red). (C) Quantification of changes in accessible volume for GFP and for the GFP-5 array in the absence and presence of PARP inhibitor (PARPi) 80 s post-microirradiation. (D) Normalized FCS correlation curves obtained for GFP at DNA damage sites before (black) and ~1–2 min after (red) microirradiation. (E) Residence time measured by FCS for GFP and GFP-5 pre- and post-DNA-damage induction. (F) Intensity and donor-lifetime images of molecular crowding sensor before (pre) and ~1–2 min after (post) DNA damage induction. Microirradiation area is highlighted with green arrowheads. Bleaching of H2B-iRFP670 shows the irradiated area. Donor-lifetime images are pseudocolored according to the look-up table displayed on the right of panel F. (G) Measurement of donor lifetime of crowding sensor in microirradiated area pre- and post-DNA damage induction. Scale bars = 4 μ m.

effect on GFP diffusion. This experiment indicates that the assay is sensitive enough to probe diffusion hindrance in the irradiated area and further supports the fact that chromatin relaxation does not facilitate diffusion in the vicinity of the DNA lesions.

Finally, to test the predicted consequence of crowding on protein conformation, we used a FRET crowding-sensor whose extension varies with the amount of macromolecular crowding (15). To confirm the functionality of this probe, we induced nuclear swelling by bathing cells with hypotonic medium, which reduces intranuclear crowding conditions and leads to chromatin relaxation (Supplementary Figure S4E). As expected, we observed an increase of the donor lifetime in hypotonic conditions compared to isotonic conditions, which reflects a decrease in FRET efficiency due to larger extension of the crowding-sensor (Supplementary Figure S4F and G). In contrast, when examined before and after DNA damage induction, no change in the donor lifetime was detected within the irradiated area suggesting that chromatin relaxation does not lead to reduced macromolecular crowding at sites of DNA damage (Figure 4F and G). We also performed the experiment using precompact chromatin as described above for diffusion hindrance measurements to assess the sensitivity of the crowding sensor. While we detected a decrease in the lifetime of the crowding-sensor upon hypertonic treatment, no change in lifetime was measured after relaxation of the hyper-compacted chromatin in response to laser irradiation (Supplementary Figure S4H). This tends to rule-out a false negative response of the crowding sensor when probing the crowding state at DNA lesions.

Overall, although we cannot formally exclude a false-negative response of our different crowding reporter assays, the quantitative analysis of crowding conditions at the DNA lesions supports the idea that the PAR-dependent recruitment of DNA-binding domains to sites of DNA damage cannot be attributed to increased accessibility of DNA due to reduced crowding conditions at the sites of DNA damage. Nevertheless, by analyzing crowding conditions, we only assessed the compaction state of the chromatin in terms of the impact of the fraction of occupied nuclear volume without considering consequences arising from changes affecting its spatial conformation. The way chromatin is organized in three dimensions is thought to affect the ability of diffusible DNA-binding proteins navigating through the nucleus to bind DNA (46). We therefore proceeded to assess how PAR-dependent changes in chromatin conformation impacts dynamic binding of DNA-binding domains to DNA at damage sites.

PAR-dependent chromatin remodeling increases the association rates of DNA-binding domains to sites of DNA damage

To better understand the mechanisms underlying the recruitment to DNA lesions of the DNA-binding domains, their local dynamics was assessed by FCS before and after laser microirradiation (Figure 5A). The association between the DNA-binding domains and DNA was modeled by the

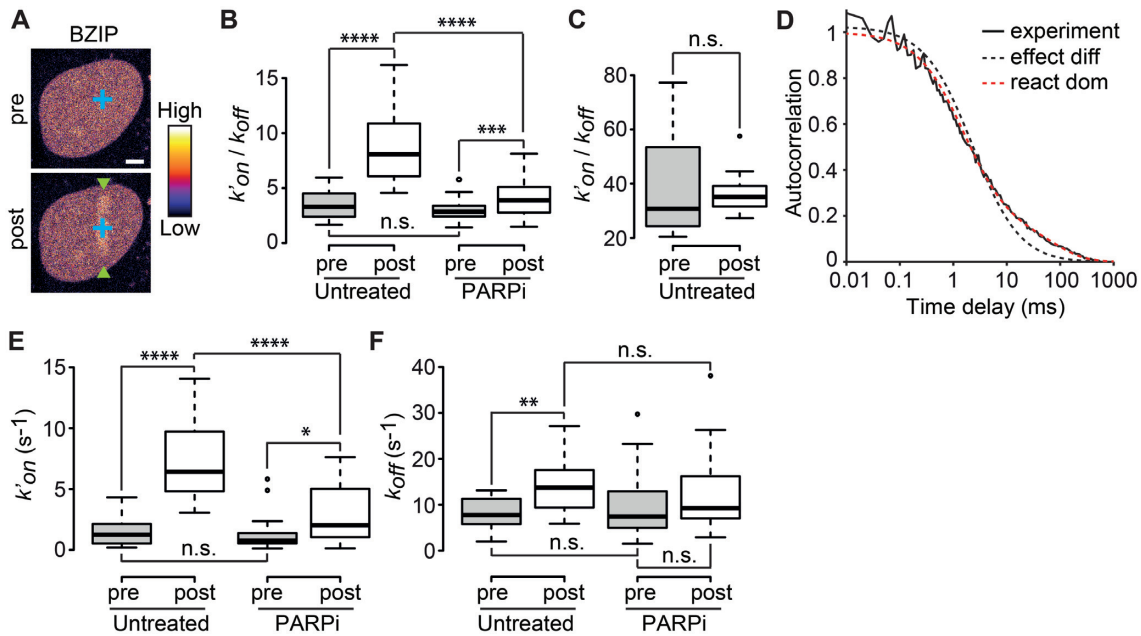
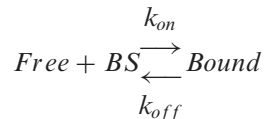


Figure 5. PAR-dependent chromatin remodeling leads to an increase in the association rates of DNA-binding domains at sites of DNA damage. (A) Representative image of a nucleus in which the FCS measurements are performed to assess the local dynamics of GFP-BZIP before (pre) and after (post) DNA-damage induction. Microirradiation area is highlighted with green arrowheads. FCS measurement points are shown in blue. Images are pseudocolored according to the look-up table displayed on the right. Scale bar = 4 μm . (B) $k'_{\text{on}} / k'_{\text{off}}$ ratios estimated from FCS curves fitted with an effective diffusion model pre- and ~ 1 –2 min after (post) DNA damage induction in the presence or absence of PARP inhibitor (PARPi) for GFP-BZIP. (C) $k'_{\text{on}} / k'_{\text{off}}$ ratios estimated from FCS curves fitted with an effective diffusion model pre- and ~ 1 –2 min after (post) DNA damage induction for GFP-LANA-1–32. (D) Normalized FCS correlation curves obtained for GFP-BZIP in undamaged nuclei. The experimental curve (continuous black line) is fitted with an effective-diffusion model (dotted black line) or a reaction-dominant model (dotted red line). (E and F) Association (k'_{on}) and dissociation rates (k'_{off}) measured by FCS for GFP-BZIP pre- and post-DNA damage and in untreated cells or cells treated with PARP inhibitor (PARPi).

following reaction:



with *Free* and *Bound* referring to the two states of the DNA-binding domain and *BS* to the binding sites along the DNA. FCS curves were fitted with an effective diffusion model to estimate the ratio $k'_{\text{on}} / k'_{\text{off}}$ according to Equation (2). k'_{on} is a pseudo first-order association rate corresponding to the product of the association rate k_{on} by the concentration of binding sites [BS]. Thus, k'_{on} depends on the local chromatin concentration which varies upon irradiation due to PAR-dependent remodeling. To assess changes in the binding kinetics which are not due to variations in chromatin concentration, $k'_{\text{on}} / k'_{\text{off}}$ ratios measured post-irradiation were corrected for chromatin relaxation according to Equation (3). Using this analysis framework, we found that all DNA-binding domains displayed an increase in the $k'_{\text{on}} / k'_{\text{off}}$ ratio after DNA damage induction (Figure 5B and Supplementary Figure S5A–C), showing a shift of the binding equilibrium towards the DNA-bound state in the damaged area. The increase in the $k'_{\text{on}} / k'_{\text{off}}$ ratio upon laser irradiation was impaired by PARPi treatment for HMG, BZIP and ZF345, but not for Homeo, which mirrors the results obtained regarding recruitment (Figures 1 and 2). In contrast to the DNA-

binding domains, the $k'_{\text{on}} / k'_{\text{off}}$ ratio measured for the histone-binding domain of LANA remained unchanged after DNA damage induction (Figure 5C), in agreement with the absence of recruitment to the lesions.

The estimation of the $k'_{\text{on}} / k'_{\text{off}}$ ratios demonstrate an increased binding at sites of DNA damage for the DNA-binding domains. However, this analysis cannot distinguish between an increase in the association rate k'_{on} , indicative of facilitated binding, or a decrease in the dissociation rate k'_{off} , implying a longer lifetime of the bound state. Estimating the association and dissociation rates separately can only be achieved for probes displaying reaction-dominant kinetics (32). In such regime, the FCS curves cannot be properly fitted with the one-component effective diffusion model (Equation (1)) but require the use of a two-components reaction-dominant model (Equation (4)). Among the three DNA-binding domains displaying PAR-dependent recruitment to DNA lesions, BZIP was the only one showing significant deviation from the effective diffusion model (Figure 5D and Supplementary Figure S5D–F). Using a reaction-dominant model for BZIP yielded improved fits of the FCS curves and allowed the estimation of the pseudo first-order association rate k'_{on} and the dissociation rate k'_{off} of the binding reaction before and after damage. The k'_{on} rates post-irradiation were calculated according to Equation (5) to assess changes in association rates that are not due to variations in chromatin concentration. In the undamaged

situation we recovered values for k'_{on} and k_{off} , which are in the same range as those previously reported for BZIP (32). Upon irradiation, we found that k'_{on} was enhanced by ~5-fold (Figure 5E) while k_{off} underwent a less prominent increase (Figure 5F). This result implies that the accumulation of BZIP at DNA-damage sites is due to facilitated binding to DNA in this area rather than a longer lifetime of the bound state (which should have led to a decreased k_{off}). Furthermore, PARPi treatment led to a significant reduction of k'_{on} post-damage while not affecting k_{off} (Figure 5E and F), indicating that PAR-dependent chromatin remodeling specifically facilitates binding to DNA at sites of damage.

Finally, to compare the behavior of the DNA-binding domains with the one of a motif recruited to DNA lesions via direct PAR binding, we probed the dynamics of the macrodomain of macroH2A1.1 at the sites of damage by FCS. While, prior to damage, the macrodomain was following an effective diffusion kinetic, a reaction-dominant model had to be used to fit the FCS curves acquired after laser irradiation (Supplementary Figure S5G). This switch from an effective diffusion to a reaction-dominant dynamic implies a massive reduction of the dissociation rate k_{off} upon DNA damage (32), in agreement with a strong binding to PAR chains. This behavior is in sharp contrast with the results obtained for BZIP for which we observed a slight increase of the dissociation rate after laser irradiation (Figure 5F).

Increased accessibility to DNase I at sites of DNA damage is promoted by PAR-signaling

The sensitivity of chromatin to nuclease digestion, such as DNase I that non specifically cleaves DNA, is broadly used in genomics to evaluate DNA accessibility (47,48). Previous studies have demonstrated the nuclease sensitive rearrangement of chromatin after UV irradiation in [³H]thymidine labeled human cells indicating that chromatin remodeling mechanisms can tune DNA accessibility during DNA damage repair (49). While it has also been shown that PAR-dependent relaxation of *in vitro* reconstituted chromatin leads to increased micrococcal nuclease sensitivity (50), it is unknown whether this also holds true in living cells subjected to DNA damage.

To test this possibility, we assessed DNase sensitivity at DNA lesions inflicted using micropore UV irradiation (33). With this irradiation method we could detect robust activation of PAR signaling as well as γ H2AX signaling, although with slower kinetics (Supplementary Figure S6A). The irradiated cells were treated with DNase and free DNA ends were labeled by the Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-based incorporation of IdU (Figure 6A). While no IdU incorporation was detected in the absence of DNase treatment (Supplementary Figure S6B and C), we observed a strong local IdU signal at sites of DNA damage in the presence of DNase I, demonstrating an increased DNase sensitivity of the chromatin at the irradiated areas as compared to the undamaged DNA (Figure 6B and C). Furthermore, inhibiting PARylation strongly reduced the incorporation of IdU at the sites of DNA damage suggesting that PAR-signaling, likely via its role in chromatin remodeling, is

responsible for the increased DNase sensitivity displayed by the damaged chromatin (Figure 6B and C). Combined with the results described in the previous sections, these findings indicate that the same PAR-dependent chromatin remodeling mechanisms underlie the recruitment of DNA-binding motifs at the sites of DNA damage observed by live-cell imaging and the increased DNase hypersensitivity used for mapping 'open' damaged chromatin regions in genomics.

The PAR-dependent recruitment of CHD4 and HP1 α to DNA lesions relies on their ability to bind DNA

Our findings indicate that early PAR-dependent chromatin remodeling promotes the recruitment of DNA-binding proteins to sites of damage due to facilitated association with DNA. To assess the relevance of this recruitment mechanism for DNA repair, we tested whether the accumulation of CHD4 and HP1, two proteins contributing to DNA repair potentially via their known functions in the regulation of the chromatin architecture (13,40), could be due to binding to DNA at unfolded damaged chromatin.

The chromatin remodeler CHD4 has been shown to be important for the repair of DNA double-strand break (DSB) by homologous recombination (HR) (51) and we recently reported that its PAR-dependent recruitment to DNA lesions is not triggered by direct PAR-binding but rather promoted by chromatin relaxation (13). Different domains of CHD4 were shown to bind DNA *in vitro*, the two chromo-domains (CD1 and CD2) (52) as well as an HMG box-like domain localized at the N-terminus (23). We analyzed the behavior of point mutations localized in each of these domains and which were suspected to affect the ability of CHD4 to bind DNA (23,28). While mutation in the HMG box-like (4A) domain did not affect CHD4 dynamics assessed by FCS, mutations W508E and W644E, localized respectively in CD1 and CD2, displayed a strong reduction of the residence time, suggesting reduced affinity for DNA in living cells (Figure 7A and B). Concomitantly, monitoring the accumulation of these mutants to sites of damage showed that the mutations W508E and W644E, but not the 4A, impaired recruitment, correlating with the reduced affinity of these mutants for DNA (Figure 7C and D).

The chromatin scaffolding protein HP1 has roles in DNA repair (40) in addition to its central function in transcription repression. Indeed, the three isoforms (HP1 α , HP1 β and HP1 γ) were shown to be recruited to DNA lesions (40) and depletion of any of them dramatically impairs efficiency of DSB repair by HR (53). Here, we focused on HP1 α (Figure 7E) and observed that its recruitment to DNA lesions was strongly impaired upon PARP inhibition (Figure 7F,G). The fact that we could not detect direct interactions between HP1 α and PARylated PARP1 using the PAR-3H assay described previously (Supplementary Figure S7), prompted us to test the involvement of DNA binding in the recruitment of HP1 α to DNA lesions. It was previously reported that HP1 α binds to DNA via its hinge domain (54) and in agreement with these findings, we measured by FCS a strong reduction of the residence time for a mutated version of HP1 α lacking the hinge domain (Δ hinge) compared to wild-type HP1 α (WT) (Figure 7H). Furthermore, deleting the hinge domain was sufficient to significantly reduce

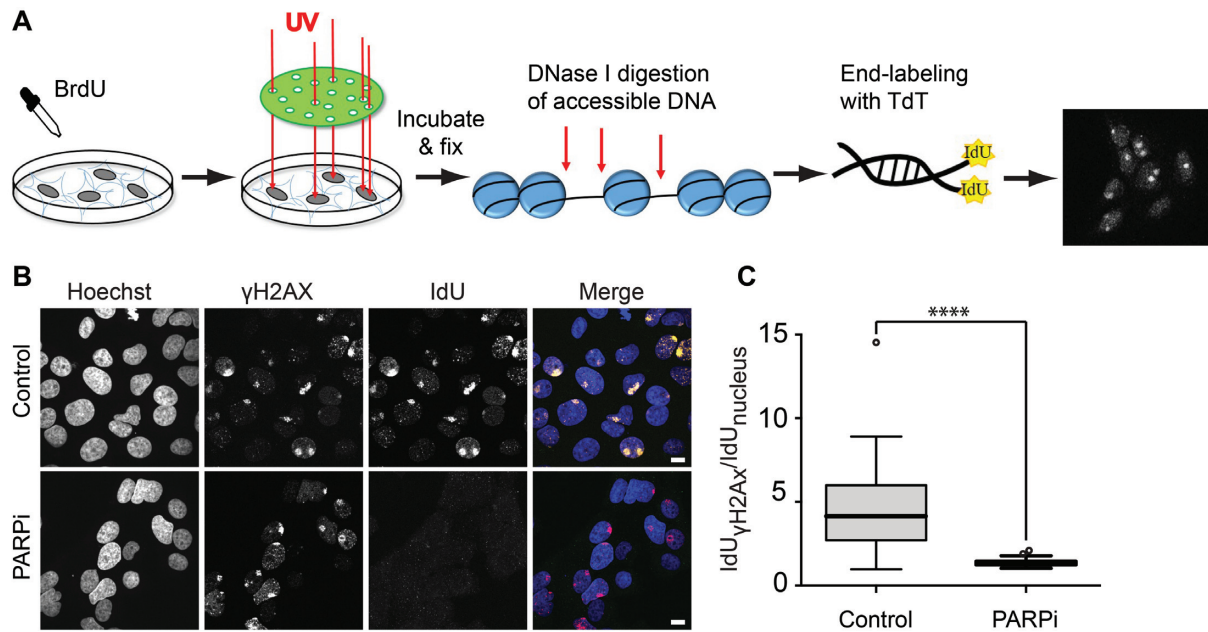


Figure 6. The accessibility of DNase I at sites of micropore irradiation is regulated by PAR-signaling. (A) Schematic representation of micropore irradiation assay. Cells are labeled with BrdU to photosensitize the DNA. After micropore irradiation (100 J/m^2 of UVC light) and fixation, chromatin is digested by DNase I. The generated free DNA-ends are labeled with IdU by Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) and visualized by immunofluorescence. (B) Representative images of the IdU-signal 30 minutes post-micropore-irradiation to analyze the chromatin accessibility to DNase I in the presence or absence of PARP inhibitor (Olaparib). The microirradiation sites are visualized with anti- γ H2AX and anti-rabbit Alexa Fluor 555 antibodies. The free DNA-ends are visualized by anti-IdU and anti-mouse Alexa Fluor 488 antibodies. Scale bar = $10 \mu\text{m}$. (C) Quantification of the IdU-signal intensity in the presence or absence of PARP inhibitor (PARPi). The irradiated areas are segmented by γ H2AX signal in Hoechst positive nuclei and the average signal intensities of the background-subtracted IdU channel are measured. These average signal intensities are divided by the signal intensities of the corresponding nuclei and plotted.

accumulation to sites of damage (Figure 7I and J). These results suggest that, similar to CHD4, the PAR-dependent recruitment of HP1 α relies on the ability of this protein to bind DNA.

DISCUSSION

The removal of PARP1, ALC1 or CHD2, all of which are key players of the PAR-dependent chromatin remodeling mechanisms characterizing the early stages of the DDR, leads to cell hypersensitivity to DNA damage (6,10,55). This suggests that the open chromatin organization established by these different actors at sites of DNA damage is essential for repair efficiency, yet its exact function remains unclear. In this current study, we report that different protein domains with affinity for DNA are recruited to sites of damage in a PAR-dependent manner and we propose that this recruitment relies on chromatin unfolding rather than direct binding to PAR chains. A more systematic analysis of the behavior of a larger spectrum of DNA as well as histone-binding domains at sites of damage would be necessary to further establish the generic nature of our findings. Nevertheless, the fact that such recruitment is observed for DNA-binding but not for histone-binding domains and that macromolecular crowding conditions remain mainly unchanged at the irradiated site, suggest that the early PAR-dependent chromatin remodeling events do not simply unfold the chromatin structure to facilitate access to damaged chromatin for any kind of nuclear protein. Rather, they promote the establishment of a particular chromatin conforma-

tion in which DNA becomes more exposed while leaving the accessibility of histones unaffected (Figure 8). This specific chromatin conformation is likely to contribute to DNA repair efficiency not only by facilitating access to DNA lesions but also by influencing the choice of the repair pathway, as was shown for the PAR-dependent remodeler CHD2 that specifically affects double-strand break repair through non-homologous end-joining (6).

Our results show a PAR-dependent increase of the pseudo first-order association rate k'_{on} of the DNA-binding domain BZIP at sites of DNA damage, in support of the increased DNA accessibility characterizing the chromatin architecture established by PAR-dependent remodeling mechanisms at DNA lesions. In future work, it would be important to confirm these findings obtained for BZIP by analyzing the behavior of other DNA-binding domains displaying interaction dynamics allowing for the estimation of the k'_{on} rates specifically. Nevertheless, our results still provide insight regarding the mechanisms by which PAR-dependent chromatin remodeling could promote recruitment to DNA lesions. Since the k'_{on} measured for BZIP is the product of the binding rate, k_{on} , and the concentration of binding sites, $[BS]$, the increase in k'_{on} could be attributed to a modulation of either of the two parameters. On the one hand, it has been reported that chromatin remodeling mechanisms that occur at DNA lesions is associated with the release of core histones (56), a process that would enhance the amount of free DNA at sites of DNA damage leading to an increase in $[BS]$. However, when we monitored core histone turnover

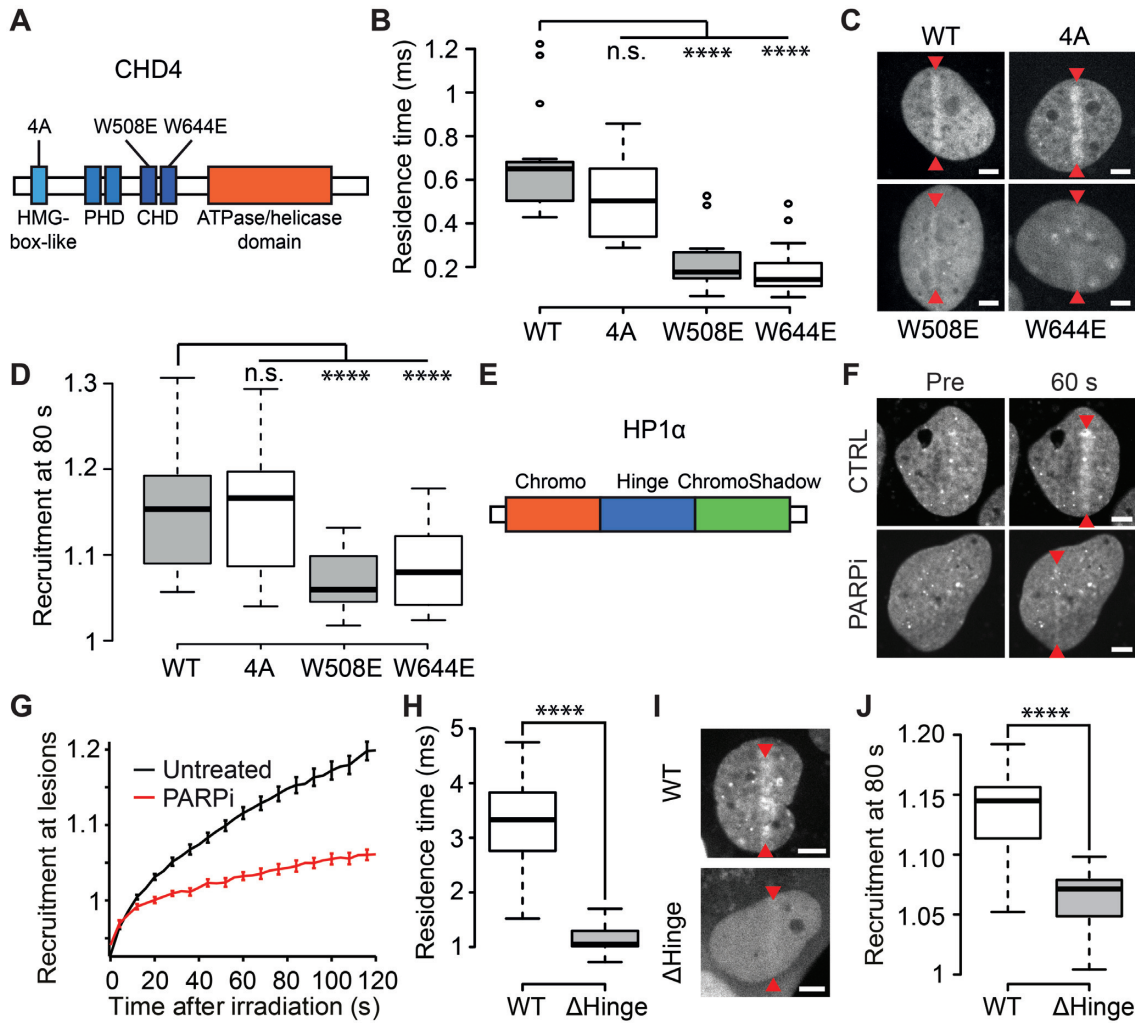


Figure 7. Recruitment of CHD4 and HP1 α to sites of DNA damage is driven by DNA binding. (A) Schematic representation of the domains of CHD4. Mutations in the HMG-box-like domain (4A) and in the chromodomains (W508E and W644E) are indicated. (B) Residence times measured by FCS in the absence of DNA damage for wild-type and mutant GFP-CHD4. (C) Confocal images showing recruitment of WT and mutant GFP-CHD4 to sites of damage 80 s post-microirradiation. Microirradiation sites are indicated by red arrowheads. (D) Recruitment intensity of wild-type and mutant GFP-CHD4 80 s post-DNA-damage induction. (E) Schematic representation of the domains of HP1 α . (F) Confocal images of GFP-HP1 α pre- and 60 s post-DNA damage induction in the presence and absence of PARP inhibitor (PARPi). (G) Recruitment kinetics of HP1 α at sites of DNA damage in the presence (red) and absence (black) of PARPi. (H) Residence times measured by FCS in the absence of DNA damage for GFP tagged wild-type HP1 α and a mutant lacking the hinge domain (Δ Hinge). (I, J) Confocal images (I) and recruitment intensity (J) showing recruitment of wild-type HP1 α -GFP and the Δ Hinge mutant 80 s post-damage induction. Microirradiation sites are indicated with red arrowheads. Scale bars = 4 μ m.

within the 2 min time frame in which we observed recruitment of the DNA-binding domains, we found no significant release of either H3 or H2B from DNA damage sites compared to undamaged conditions (Supplementary Figure S8). In contrast to the absence of release of core histone within the studied time frame, it has been shown that the histone linker H1 is quickly displaced from the chromatin upon damage (57). Such eviction of H1 as well as partial unwrapping of nucleosomes or changes in the fiber conformation triggered by PARylation, might be sufficient to increase $[BS]$ due to the uncovering of DNA stretches that were inaccessible in the undamaged chromatin. The PAR-dependent increase in DNase I accessibility observed at DNA lesions is in line with this hypothesis, since DNase I cleavage activity is inhibited by the nucleosomes (48). On the other hand, early chromatin remodeling may also in-

crease the association rate, k_{on} . Indeed, k_{on} is not only a function of the ‘chemical’ affinity of the DNA-binding protein for the DNA, which is probably not affected by chromatin remodeling, but also depends on how fast this protein finds a binding site on the DNA (44). It has been proposed by several groups that the search process in the nucleus is influenced by chromatin conformation (58–60), switching from local and systematic exploration in compact heterochromatin to more long-range sparse exploration in the less-compact euchromatin (19). In the context of DNA repair, the PAR-dependent increase in DNA exposure due to the uncovering of previously hidden DNA stretches or the reduction of the target-search time could thus ensure the timely detection of the DNA lesions by later actors of the repair machinery (61). Noteworthy, such PAR-dependent facilitated binding to DNA observed in the context of the

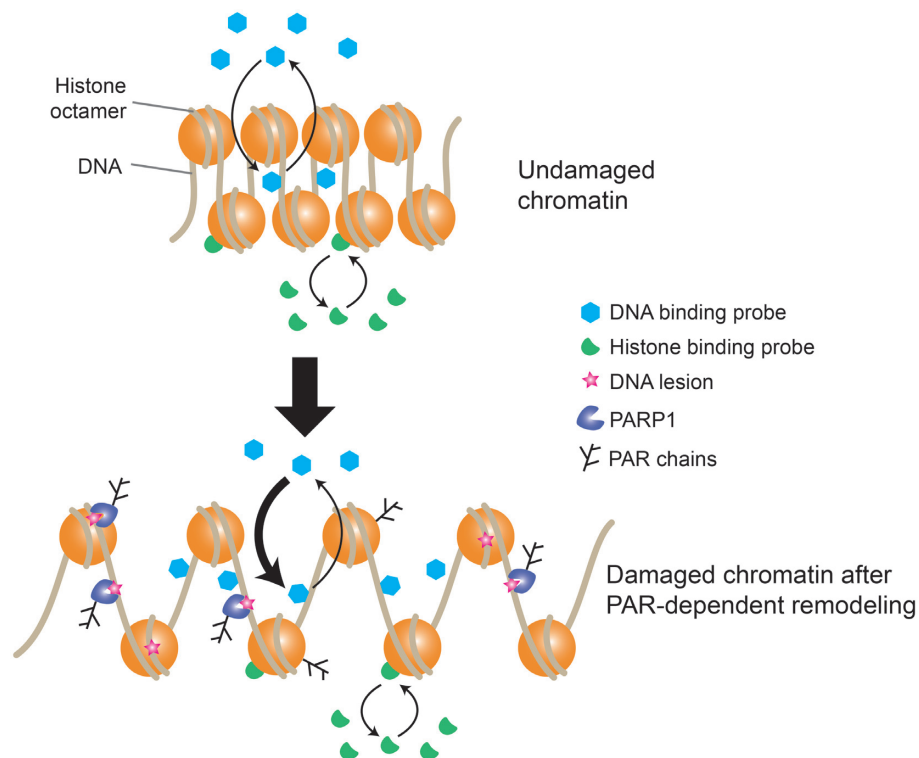


Figure 8. Model of the impact of PAR-dependent chromatin remodeling at DNA-damage sites. In undamaged chromatin, DNA-binding and histone-binding domains interact dynamically with chromatin at equilibrated rates. Upon DNA damage, PARP1 is activated and induces chromatin remodeling. The newly established chromatin architecture is characterized by facilitated association with DNA, as evidenced by increased binding rates of DNA-binding protein, while interaction dynamics with histones remains unchanged.

DDR might also hold true during transcription regulation. Such a mechanism may contribute, for example, to the recruitment of CHD4 at heat-shock genes undergoing PAR-dependent puffing in *Drosophila* (62). It may also explain why mutating CHD4 at residues W508E and W644E, which reduces its affinity for DNA (Figure 7B), impairs the ability of this remodeler to inhibit transcription (28). This recruitment mechanism may also be at play in the context of the PAR-dependent binding of the heat-shock transcription factor 1 to DNA (63).

We also found that, while weak DNA-binding domains require PAR-dependent chromatin remodeling to recruit efficiently to sites of DNA damage, domains displaying a stronger affinity for DNA were recruited independently of PARylation (Figures 1 and 2). This result suggests that, for these strong DNA-binding domains, chromatin remodeling processes controlled by signaling pathways other than PARylation, such as the mobilization of linker histone H1 (10) or core histone acetylation (64,65), might be sufficient to promote recruitment at DNA lesions. Moreover, the recruitment of high affinity DNA-binding domains at DNA lesions observed even after PARP inhibition may provide a mechanism for PARP-independent repair, such as certain base-excision repair pathways (66) or double-strand break repair via Ku-dependent non-homologous end joining (67).

A recent screen monitoring the accumulation of 70 different proteins to sites of DNA damage demonstrated that PAR-signaling regulates the recruitment kinetics of a majority of these proteins (68). Our findings, together with pre-

vious work (11,13), indicate that such PAR-dependent recruitment may not solely rely on direct PAR-binding but likely also involves enhanced binding to DNA at damaged chromatin remodeled by PAR-dependent mechanisms. Our present results, together with our previous work (13), indicate that this PAR-dependent recruitment mechanism can account for the accumulation of CHD4, and also probably CHD3, at the sites of damage. Future work will be necessary to establish whether this recruitment mode also holds true for other DNA-binding repair proteins or for regulatory factors modulating the activity of these repair proteins such as the recently identified regulation of the Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) kinase by homeobox transcription factors (69). Furthermore, the recruitment via enhanced DNA binding of proteins displaying functions in transcription modulation may contribute to the early repression of transcription at the sites of DNA damage (70). In line with this hypothesis, we show that the PAR-dependent recruitment of HP1 α , a chromatin-scaffolding protein involved in transcription silencing, relies on its ability to bind DNA. Conversely, this recruitment mechanism may also explain the PAR-dependent accumulation of transcription factors to DNA lesions ((11) and this study), a potential early step of transcription-coupled repair mechanisms (71). Nevertheless, the potentially generic nature of the PAR-dependent recruitment via enhanced DNA association may also drive the accumulation at DNA lesions of DNA-binding proteins with no functional role in DNA repair. Therefore, after an initial generic protein accumula-

tion phase, one might expect ‘filtering’ by specific retention mechanisms to keep only factors with roles in DDR at the damage sites. It was shown that PAR chains can drive liquid demixing at DNA lesions, allowing the filtering of proteins based on electrostatic interactions and their degree of structural disorder (72). In addition to phase separation, this filtering step might also involve later chromatin reorganization events, including further relaxation and recondensation (13,73) as well as post-translational modifications (74). This hypothesis then suggests that in the future it will be important to address which proteins are retained in the damaged area and what the underlying ‘filtering’ mechanisms are.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Microscopy Rennes Imaging Center (BIOSIT, Université Rennes 1) for technical assistance. This work would not have been possible without the generous donation of plasmids from a number of people. We would like to specifically thank Jeffrey Macklis for the Sox5 plasmid, Arnold Boersma for the crowding FRET sensor, Kenneth Kaye for the GFP-LANA-1-32 plasmid, Michael Bustin for the YFP-HMG2-NBD (HMG2-ΔC43) plasmid, Jun Aruga for the ZIC3 plasmids, Dong-er Zhang for the C/EBPa plasmid, Richard Day for the GFP-tagged full length C/EBPa plasmid, Sophie Polo for GFP-CHD4, James Hagman for pBluescript-CHD4 domain mutants, Ana Silva for GFP-CHD4 (4A), Vladislav Verkhusa for iRFP670-N1, Jan Ellenberg for paGFP-H2B and Johnathan Chubb for pH3-paGFP. We also thank Ivan Ahel for his gift of purified PARP1, James McNally and Davide Mazza for sharing MatLab codes used for fitting the FCS correlation curves and Malte Wachsmuth for his advice when using the Fluctuation Analyzer 4G software.

Author contributions: R.S., T.L., S.J., O.D., S.D., P.B. and S.H. completed the experiments within the manuscript. C.C. and C.B. generated cell lines and DNA constructs. G.T. and S.H. conceived and supervised this study. R.S., S.H. and G.T. wrote the manuscript. All authors read and commented on the manuscript.

FUNDING

People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union’s Seventh Framework Programme (FP7/ 2007–2013) under REA grant agreement [PCOFUND-GA-2013-609102]; PRESTIGE program coordinated by Campus France [PRESTIGE-2017-2-0042]; Université Bretagne-Loire; Fondation ARC pour la recherche sur le cancer [PDF20181208405 to R.S.]; Hungarian Academy of Sciences [LP2017-11/2017 to G.T.]; Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest (committees 35, 22 and 72); Fondation ARC pour la recherche sur le cancer [20161204883]; Agence Nationale de la Recherche [PRC-2018 REPAIRCHROM]; Institut Universitaire de France (to S.H.); Max Planck Research Group Leader Program, Max Planck Society (to

C.B.); National Research Development and Innovation Office [NKFIH K-119361 to P.B.]; the collaboration between S.H. and G.T. benefited from funding from the CNRS via the PICS program. Funding for open access charge: Agence Nationale de la Recherche.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Liu, C., Vyas, A., Kassab, M.A., Singh, A.K. and Yu, X. (2017) The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 8129–8141.
- Ohgushi, H., Yoshihara, K. and Kamiya, T. (1980) Bovine thymus poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase. Physical properties and binding to DNA. *J. Biol. Chem.*, **255**, 6205–6211.
- Langelier, M.-F., Planck, J.L., Roy, S. and Pascal, J.M. (2012) Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science*, **336**, 728–732.
- Gibbs-Seymour, I., Fontana, P., Rack, J.G.M. and Ahel, I. (2016) HPF1/C4orf27 is a PARP-1-interacting protein that regulates PARP-1 ADP-ribosylation activity. *Mol. Cell*, **62**, 432–442.
- Gottschalk, A.J., Timinszky, G., Kong, S.E., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Florens, L., Ladurner, A.G., Conaway, J.W. *et al.* (2009) Poly(ADP-ribosylation) directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 13770–13774.
- Luijsterburg, M.S., de Krijger, I., Wiegant, W.W., Shah, R.G., Smeenk, G., de Groot, A.J.L., Pines, A., Vertegaal, A.C.O., Jacobs, J.J.L., Shah, G.M. *et al.* (2016) PARP1 links CHD2-mediated chromatin expansion and H3.3 deposition to DNA repair by Non-homologous End-Joining. *Mol. Cell*, **61**, 547–562.
- Lehmann, L.C., Hewitt, G., Aibara, S., Leitner, A., Marklund, E., Maslen, S.L., Maturi, V., Chen, Y., van der Spoel, D., Skehel, J.M. *et al.* (2017) Mechanistic insights into autoinhibition of the oncogenic chromatin remodeler ALC1. *Mol. Cell*, **68**, 847–859.e7.
- Da Rosa, P.A., Wang, Z., Jiang, X., Pruneda, J.N., Cong, F., Klevit, R.E. and Xu, W. (2015) Allosteric activation of the RNF146 ubiquitin ligase by a poly(ADP-ribosylation) signal. *Nature*, **517**, 223–226.
- Poirier, G.G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C. and Mandel, P. (1982) Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3423–3427.
- Sellou, H., Lebeaupin, T., Chapuis, C., Smith, R., Hegele, A., Singh, H.R., Kozłowski, M., Bultmann, S., Ladurner, A.G., Timinszky, G. *et al.* (2016) The poly(ADP-ribose)-dependent chromatin remodeler Alc1 induces local chromatin relaxation upon DNA damage. *Mol. Biol. Cell*, **27**, 3791–3799.
- Izhar, L., Adamson, B., Ciccia, A., Lewis, J., Pontano-Vaites, L., Leng, Y., Liang, A.C., Westbrook, T.F., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (2015) A systematic analysis of factors localized to damaged chromatin reveals PARP-Dependent recruitment of transcription factors. *Cell Rep.*, **11**, 1486–1500.
- Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M. and Althaus, F.R. (2000) Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.*, **275**, 40974–40980.
- Smith, R., Sellou, H., Chapuis, C., Huet, S. and Timinszky, G. (2018) CHD3 and CHD4 recruitment and chromatin remodeling activity at DNA breaks is promoted by early poly(ADP-ribose)-dependent chromatin relaxation. *Nucleic Acids Res.*
- Timinszky, G., Till, S., Hassa, P.O., Hothorn, M., Kustatscher, G., Nijmeijer, B., Colombelli, J., Altmeyer, M., Stelzer, E.H.K., Scheffzek, K. *et al.* (2009) A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 923–929.
- Boersma, A.J., Zuhorn, I.S. and Poolman, B. (2015) A sensor for quantification of macromolecular crowding in living cells. *Nat. Methods*, **12**, 227–229, 1 p following 229.
- Barbera, A.J., Chodaparambil, J.V., Kelley-Clarke, B., Joukov, V., Walter, J.C., Luger, K. and Kaye, K.M. (2006) The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi’s sarcoma herpesvirus LANA. *Science*, **311**, 856–861.

17. Müller, I., Boyle, S., Singer, R.H., Bickmore, W.A. and Chubb, J.R. (2010) Stable morphology, but dynamic internal reorganisation, of interphase human chromosomes in living cells. *PLoS One*, **5**, e11560.
18. Ueda, T., Catez, F., Gerlitz, G. and Bustin, M. (2008) Delineation of the protein module that anchors HMGN proteins to nucleosomes in the chromatin of living cells. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 2872–2883.
19. Bancaud, A., Huet, S., Daigle, N., Mozziconacci, J., Beaudouin, J. and Ellenberg, J. (2009) Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J.*, **28**, 3785–3798.
20. Schaufele, F., Enwright, J.F., Wang, X., Teoh, C., Srihari, R., Erickson, R., MacDougald, O.A. and Day, R.N. (2001) CCAAT/enhancer binding protein alpha assembles essential cooperating factors in common subnuclear domains. *Mol. Endocrinol.*, **15**, 1665–1676.
21. Beaudouin, J., Mora-Bermúdez, F., Klee, T., Daigle, N. and Ellenberg, J. (2006) Dissecting the contribution of diffusion and interactions to the mobility of nuclear proteins. *Biophys. J.*, **90**, 1878–1894.
22. Polo, S.E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y. and Jackson, S.P. (2010) Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *EMBO J.*, **29**, 3130–3139.
23. Silva, A.P.G., Ryan, D.P., Galanty, Y., Low, J.K.K., Vandevenne, M., Jackson, S.P. and Mackay, J.P. (2016) The N-terminal region of chromodomain helicase DNA-binding Protein 4 (CHD4) is essential for activity and contains a high mobility group (HMG) Box-like-domain that can bind Poly(ADP-ribose). *J. Biol. Chem.*, **291**, 924–938.
24. Hatayama, M., Tomizawa, T., Sakai-Kato, K., Bouvagnet, P., Kose, S., Imamoto, N., Yokoyama, S., Utsunomiya-Tate, N., Mikoshiba, K., Kigawa, T. et al. (2008) Functional and structural basis of the nuclear localization signal in the ZIC3 zinc finger domain. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3459–3473.
25. Shcherbakova, D.M. and Verkhusha, V.V. (2013) Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nat. Methods*, **10**, 751–754.
26. Neumann, B., Walter, T., Hériché, J.-K., Bulkescher, J., Erfle, H., Conrad, C., Rogers, P., Poser, I., Held, M., Liebel, U. et al. (2010) Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature*, **464**, 721–727.
27. Zhang, D.E., Hetherington, C.J., Meyers, S., Rhoades, K.L., Larson, C.J., Chen, H.M., Hiebert, S.W. and Tenen, D.G. (1996) CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1231–1240.
28. Ramírez, J., Dege, C., Kutateladze, T.G. and Hagman, J. (2012) MBD2 and multiple domains of CHD4 are required for transcriptional repression by Mi-2/NuRD complexes. *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 5078–5088.
29. Walter, A., Chapuis, C., Huet, S. and Ellenberg, J. (2013) Crowded chromatin is not sufficient for heterochromatin formation and not required for its maintenance. *J. Struct. Biol.*, **184**, 445–453.
30. Wachsmuth, M., Conrad, C., Bulkescher, J., Koch, B., Mahen, R., Isokane, M., Pepperkok, R. and Ellenberg, J. (2015) High-throughput fluorescence correlation spectroscopy enables analysis of proteome dynamics in living cells. *Nat. Biotechnol.*, **33**, 384–389.
31. Lebeaupin, T., Smith, R., Huet, S. and Timinszky, G. (2017) Poly(ADP-ribose)-dependent chromatin remodeling in DNA repair. *Methods Mol. Biol.*, **1608**, 165–183.
32. Michelman-Ribeiro, A., Mazza, D., Rosales, T., Stasevich, T.J., Boukari, H., Rishi, V., Vinson, C., Knutson, J.R. and McNally, J.G. (2009) Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, **97**, 337–346.
33. Suzuki, K., Yamauchi, M., Oka, Y., Suzuki, M. and Yamashita, S. (2011) Creating localized DNA double-strand breaks with microirradiation. *Nat. Protoc.*, **6**, 134–139.
34. Kamentsky, L., Jones, T.R., Fraser, A., Bray, M.-A., Logan, D.J., Madden, K.L., Ljosa, V., Rueden, C., Eliceiri, K.W. and Carpenter, A.E. (2011) Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinforma. Oxf. Engl.*, **27**, 1179–1180.
35. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B. et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 676–682.
36. 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.
37. Privalov, P.L., Jelesarov, I., Read, C.M., Dragan, A.I. and Crane-Robinson, C. (1999) The energetics of HMG box interactions with DNA: thermodynamics of the DNA binding of the HMG box from mouse sox-5. *J. Mol. Biol.*, **294**, 997–1013.
38. LaRonde-LeBlanc, N.A. and Wolberger, C. (2003) Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev.*, **17**, 2060–2072.
39. Kato, H., van Ingen, H., Zhou, B.-R., Feng, H., Bustin, M., Kay, L.E. and Bai, Y. (2011) Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl-based NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 12283–12288.
40. 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.
41. Kustatscher, G., Hothorn, M., Pugieux, C., Scheffzek, K. and Ladurner, A.G. (2005) Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 624–625.
42. Wang, Z., Michaud, G.A., Cheng, Z., Zhang, Y., Hinds, T.R., Fan, E., Cong, F. and Xu, W. (2012) Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosylation)-dependent ubiquitination. *Genes Dev.*, **26**, 235–240.
43. Satoh, M.S. and Lindahl, T. (1992) Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*, **356**, 356–358.
44. Lebeaupin, T., Smith, R. and Huet, S. (2018) 9 - The multiple effects of molecular crowding in the cell nucleus: From molecular dynamics to the regulation of nuclear architecture. In Lavelle, C. and Victor, J.-M. (eds.), *Nuclear Architecture and Dynamics*. Translational Epigenetics. Academic Press, Boston, Vol. 2, pp. 209–232.
45. Hall, D. and Minton, A.P. (2003) Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges. *Biochim. Biophys. Acta*, **1649**, 127–139.
46. Cortini, R. and Filion, G.J. (2018) Theoretical principles of transcription factor traffic on folded chromatin. *Nat. Commun.*, **9**, 1740.
47. Burkholder, G.D. and Weaver, M.G. (1977) DNA-protein interactions and chromosome banding. *Exp. Cell Res.*, **110**, 251–262.
48. Boyle, A.P., Davis, S., Shulha, H.P., Meltzer, P., Margulies, E.H., Weng, Z., Furey, T.S. and Crawford, G.E. (2008) High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell*, **132**, 311–322.
49. 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.
50. Kim, M.Y., Mauro, S., Gévry, N., Lis, J.T. and Kraus, W.L. (2004) NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*, **119**, 803–814.
51. Qi, W., Chen, H., Xiao, T., Wang, R., Li, T., Han, L. and Zeng, X. (2016) Acetyltransferase p300 collaborates with chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4) to facilitate DNA double-strand break repair. *Mutagenesis*, **31**, 193–203.
52. Bouazoune, K., Mitterweger, A., Längst, G., Imhof, A., Akhtar, A., Becker, P.B. and Brehm, A. (2002) The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization. *EMBO J.*, **21**, 2430–2440.
53. Lee, Y.-H., Kuo, C.-Y., Stark, J.M., Shih, H.-M. and Ann, D.K. (2013) HPI promotes tumor suppressor BRCA1 functions during the DNA damage response. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5784–5798.
54. Bryan, L.C., Weilandt, D.R., Bachmann, A.L., Kilic, S., Lechner, C.C., Odermatt, P.D., Fantner, G.E., Georgeon, S., Hantschel, O., Hatzimanikatis, V. et al. (2017) Single-molecule kinetic analysis of HPI-chromatin binding reveals a dynamic network of histone modification and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 10504–10517.
55. Ahel, D., Horejsi, Z., Wiechens, N., Polo, S.E., Garcia-Wilson, E., Ahel, I., Flynn, H., Skehel, M., West, S.C., Jackson, S.P. et al. (2009)

- Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science*, **325**, 1240–1243.
56. Adam, S., Dabin, J., Chevallerier, O., Leroy, O., Baldeyron, C., Corpet, A., Lomonte, P., Renaud, O., Almouzni, G. and Polo, S.E. (2016) Real-time tracking of parental histones reveals their contribution to chromatin integrity following DNA damage. *Mol. Cell*, **64**, 65–78.
 57. Strickfaden, H., McDonald, D., Kruhlik, M.J., Haince, J.-F., Th'ng, J.P.H., Rouleau, M., Ishibashi, T., Corry, G.N., Ausio, J., Underhill, D.A. *et al.* (2016) Poly(ADP-ribosylation)-dependent transient chromatin decondensation and histone displacement following laser microirradiation. *J. Biol. Chem.*, **291**, 1789–1802.
 58. Erdel, F., Schubert, T., Marth, C., Längst, G. and Rippe, K. (2010) Human ISWI chromatin-remodeling complexes sample nucleosomes via transient binding reactions and become immobilized at active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 19873–19878.
 59. Erdel, F., Krug, J., Längst, G. and Rippe, K. (2011) Targeting chromatin remodelers: signals and search mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **1809**, 497–508.
 60. Knight, S.C., Xie, L., Deng, W., Guglielmi, B., Witkowsky, L.B., Bosanac, L., Zhang, E.T., El Beheiry, M., Masson, J.-B., Dahan, M. *et al.* (2015) Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science*, **350**, 823–826.
 61. Normanno, D., Boudarène, L., Dugast-Darzacq, C., Chen, J., Richter, C., Proux, F., Bénichou, O., Voituriez, R., Darzacq, X. and Dahan, M. (2015) Probing the target search of DNA-binding proteins in mammalian cells using TetR as model searcher. *Nat. Commun.*, **6**, 7357.
 62. Tulin, A. and Spradling, A. (2003) Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science*, **299**, 560–562.
 63. Fujimoto, M., Takii, R., Katiyar, A., Srivastava, P. and Nakai, A. (2018) Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Promotes the human heat shock response by facilitating heat shock transcription factor 1 Binding to DNA. *Mol. Cell Biol.*, **38**, e00051.
 64. Ogiwara, H., Ui, A., Otsuka, A., Satoh, H., Yokomi, I., Nakajima, S., Yasui, A., Yokota, J. and Kohno, T. (2011) Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene*, **30**, 2135–2146.
 65. Toiber, D., Erdel, F., Bouazoune, K., Silberman, D.M., Zhong, L., Mulligan, P., Sebastian, C., Cosentino, C., Martinez-Pastor, B., Giacosa, S. *et al.* (2013) SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling. *Mol. Cell*, **51**, 454–468.
 66. Campalans, A., Kortulewski, T., Amouroux, R., Menoni, H., Vermeulen, W. and Radicella, J.P. (2013) Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3115–3129.
 67. Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H. and Iliakis, G. (2006) PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6170–6182.
 68. Aleksandrov, R., Dotchev, A., Poser, I., Krastev, D., Georgiev, G., Panova, G., Babukov, Y., Danovski, G., Dyankova, T., Hubatsch, L. *et al.* (2018) Protein dynamics in complex DNA lesions. *Mol. Cell*, **69**, 1046–1061.e5.
 69. Johnson, T.E., Lee, J.-H., Myler, L.R., Zhou, Y., Mosley, T.J., Yang, S.-H. and Bio-Bricks for Molecular Machines FRI StreamBio-Bricks for Molecular Machines FRI Stream, Uprety, N., Kim, J. and Paull, T.T. (2018) Homeodomain proteins directly regulate ATM kinase activity. *Cell Rep.*, **24**, 1471–1483.
 70. Ayrapetov, M.K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y. and Price, B.D. (2014) DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, 9169–9174.
 71. Foustier, M. and Mullenders, L.H.F. (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.*, **18**, 73–84.
 72. Altmeyer, M., Neelsen, K.J., Teloni, F., Pozdnyakova, I., Pellegrino, S., Gröfte, M., Rask, M.-B.D., Streicher, W., Jungmichel, S., Nielsen, M.L. *et al.* (2015) Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose). *Nat. Commun.*, **6**, 8088.
 73. Burgess, R.C., Burman, B., Kruhlik, M.J. and Misteli, T. (2014) Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. *Cell Rep.*, **9**, 1703–1717.
 74. Khurana, S., Kruhlik, M.J., Kim, J., Tran, A.D., Liu, J., Nyswaner, K., Shi, L., Jailwala, P., Sung, M.-H., Hakim, O. *et al.* (2014) A macrohistone variant links dynamic chromatin compaction to BRCA1-dependent genome maintenance. *Cell Rep.*, **8**, 1049–1062.



Review

Lost in the Crowd: How Does Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1 (OGG1) Find 8-Oxoguanine in the Genome?

Ostiane D'Augustin ^{1,2} , Sébastien Huet ^{2,3,*} , Anna Campalans ^{1,*} and Juan Pablo Radicella ^{1,*}

- ¹ Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Institut de Biologie François Jacob, CEA, Université Paris-Saclay, Université de Paris, 18 route du Panorama, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France; ostiane.daugustin@univ-rennes1.fr
- ² Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de génétique et développement de Rennes)-UMR 6290, BIOSIT-UMS3480, F-35000 Rennes, France
- ³ Institut Universitaire de France, F-75000 Paris, France
- * Correspondence: sebastien.huet@univ-rennes1.fr (S.H.); anna.campalans@cea.fr (A.C.); pablo.radicella@cea.fr (J.P.R.)

Received: 30 September 2020; Accepted: 4 November 2020; Published: 7 November 2020



Abstract: The most frequent DNA lesion resulting from an oxidative stress is 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG). 8-oxoG is a premutagenic base modification due to its capacity to pair with adenine. Thus, the repair of 8-oxoG is critical for the preservation of the genetic information. Nowadays, 8-oxoG is also considered as an oxidative stress-sensor with a putative role in transcription regulation. In mammalian cells, the modified base is excised by the 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), initiating the base excision repair (BER) pathway. OGG1 confronts the massive challenge that is finding rare occurrences of 8-oxoG among a million-fold excess of normal guanines. Here, we review the current knowledge on the search and discrimination mechanisms employed by OGG1 to find its substrate in the genome. While there is considerable data from *in vitro* experiments, much less is known on how OGG1 is recruited to chromatin and scans the genome within the cellular nucleus. Based on what is known of the strategies used by proteins searching for rare genomic targets, we discuss the possible scenarios allowing the efficient detection of 8-oxoG by OGG1.

Keywords: OGG1; 8-oxoG; DNA repair; base excision repair; search mechanism

1. 8-Oxoguanine: Biological Relevance and Repair

1.1. Biological Prominence and Consequences of 8-Oxoguanine

Reactive oxygen species (ROS) arise within the cell as a consequence of the cellular metabolism as well as of the exposure to environmental factors. While ROS are required for the normal functioning of the cell, an intracellular excess of ROS leads to oxidative stress resulting in the abnormal oxidation of biological macromolecules. In the case of DNA, ROS can induce a plethora of chemical modifications, including strand breaks and oxidized bases. Amongst the latter, 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), an oxidized form of guanine, is the most abundant [1,2]. Indeed, in human cells 8-oxoG is present at a steady state level of two to three residues per 10^6 guanines [3,4]. Its predominance is likely due to guanine having the lowest oxidative potential among all DNA (and RNA) bases [5,6]. Guanine can be oxidized directly or upon electron transfer from one base to another over distances up to 37 Å due to π -stacking interactions between the bases, the 5'-G of a 5'-GG-3' doublet being the most likely to be oxidized [7].

Accumulation of oxidative base damage in genomic DNA and deficiency in its repair, have been associated with several pathologies and ageing [8,9]. While these effects mostly originate from mutations consecutive to base oxidation, 8-oxoG was also reported to interfere with telomere replication leading to genomic instability and ageing-related diseases [10–14]. Oxidation of mitochondrial DNA has also been implicated in neurodegenerative diseases and ageing. Confirming the deleterious consequences of 8-oxoG accumulation in DNA, mutations affecting the genes coding for the enzymes involved in the repair of this lesion are linked to several human diseases [15].

8-oxoG only differs from normal guanine by two atoms: C8 and N7, harbouring an oxygen instead of a hydrogen, and a hydrogen instead of an electron pair, respectively (Figure 1a). While 8-oxoG affects the thermodynamic stability of the duplex [16,17], structural studies showed that its presence induces little or no distortion of the DNA helix, yielding a normal Watson–Crick base-pairing arrangement [18–20]. As a consequence, 8-oxoG does not block DNA replication, although it may decrease the rate of DNA synthesis or induce pausing of the polymerase [21]. Nor does it constitute a permanent barrier to transcription [22]. Yet, the capacity of 8-oxoG to form a Hoogsteen base pair with an adenine through an *anti-syn* conformation (Figure 1b) [19,23] leads to the frequent incorporation of adenine opposite to 8-oxoG during DNA synthesis [24,25]. Upon further replication, a G:C to T:A transversion is fixed, making of 8-oxoG a highly pre-mutagenic lesion [26] (Figure 1c). Similarly, the 8-oxoG:A Hoogsteen base pair can occur during transcription, resulting in mutant RNAs [27].

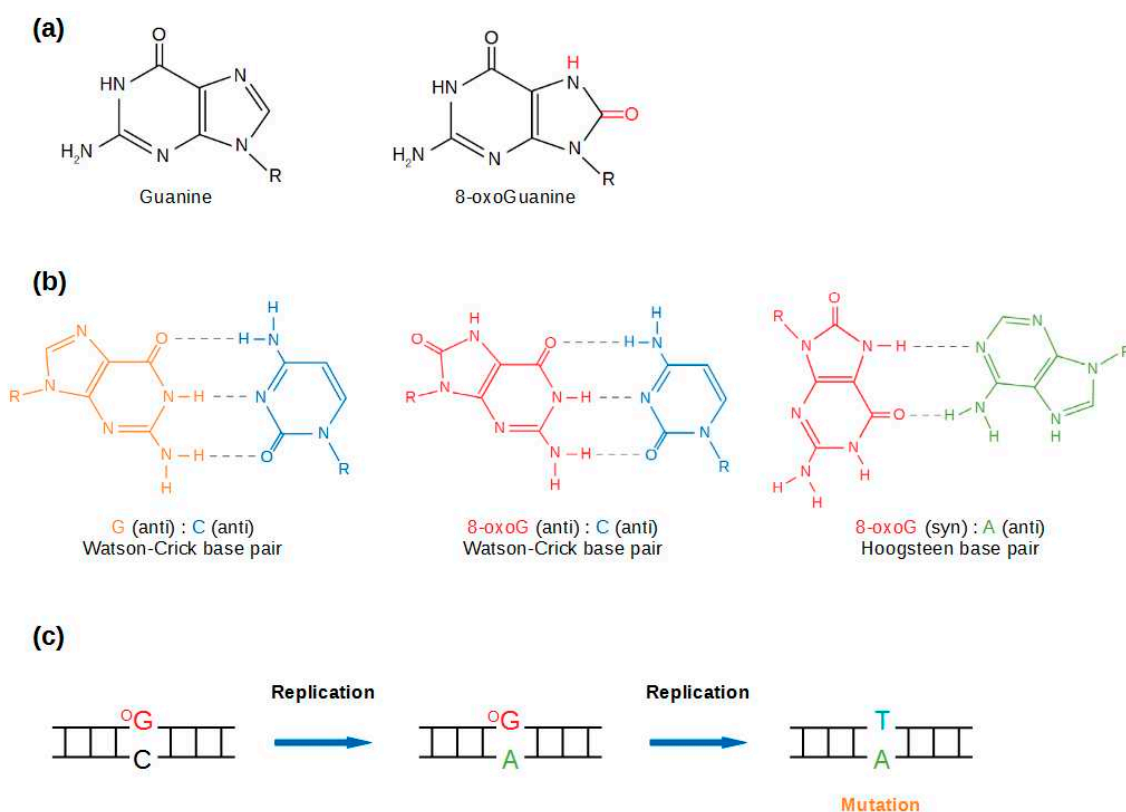


Figure 1. 8-oxoG is a premutagenic lesion. (a) 8-oxoG and G. Differences are represented in red. (b) G:C, 8-oxoG:C and 8-oxoG:A base pairs. (c) Fixation of a transversion due to the presence of 8-oxoG.

1.2. 8-oxoG Repair in Mammalian Cells

In cells, the removal of non-canonical or damaged bases from DNA is achieved mainly by the base excision repair (BER) pathway. This pathway has been extensively reviewed over time [28–30]. The initial step in the repair is the recognition of the modified base and cleavage of the N-glycosidic bond by a specific DNA glycosylase to generate an abasic (AP) site. The AP site is processed by the downstream enzymes of the pathway.

The discovery and characterization of the yeast 8-oxoG DNA glycosylase [31,32] allowed the identification of the mammalian orthologue (OGG1) [33–39]. Like the yeast enzyme, mammalian OGG1 has a strong preference for the excision of 8-oxoG paired to a cytosine, rather than to other bases. Cleavage of the 8-oxoG N-glycosidic bond by OGG1 leaves an AP site. While OGG1 can act *in vitro* as a bifunctional DNA glycosylase, the β -elimination cleavage of the AP site seems to be uncoupled from the DNA glycosylase activity [40–42].

Although other DNA glycosylases as well as a reconstituted nucleotide excision repair (NER) system are capable of excising 8-oxoG from oligonucleotides, in all cases their activity is very low compared to that of OGG1 and the relevance for their role in preventing 8-oxoG-induced mutagenesis remains unproven [15,43]. Furthermore, OGG1 appears unable to excise 8-oxoG in the context of tandem lesions, suggesting that alternative DNA glycosylases or repair systems other than BER (i.e., NER) could handle 8-oxoG in those contexts [44].

2. How Does OGG1 Find 8-oxoG Amongst a Million-Fold Excess of Gs?

The molecular mechanism of 8-oxoG excision by DNA glycosylases has been thoroughly explored by biochemical and structural approaches [15,45]. Here, we will focus on the search and recognition of 8-oxoG by OGG1. As mentioned above, the presence of 8-oxoG does not induce helix distortion, neither does it create replication or transcription blockage, raising a set of challenges for OGG1 in order to efficiently locate the oxidized guanine against a high background of undamaged bases.

2.1. 8-oxoG Recognition by OGG1 on Naked DNA

The mechanism of lesion recognition by OGG1 has received extensive attention, mostly through the study of the structure of the protein and some mutant derivatives in the presence of DNA harbouring an 8-oxoG residue. The initial studies led to propose a mechanism by which the enzyme facilitates the extrusion (flip-out) of the damaged base from the interior of the DNA helix due to a disruption of the base pairing induced by local DNA bending [46]. In this model, the specificity for 8-oxoG would be ensured by the fact that 8-oxoG:C pairs show increased flexibility and a reduced base extrusion energy barrier compared to G-C pairs [47]. However, OGG1 interrogates undamaged DNA by inducing drastic kinks [48] also extruding normal guanine residues into a so-called “exosite” in the protein [49–51]. Molecular dynamics simulations suggest that DNA deformation provides several gating steps for the recognition of the modified base [52]. Consistently, OGG1 conformation seems to evolve during the different steps, from the interrogation of undamaged DNA (interrogation complex), the encounter of the 8-oxoG and its extrusion (encounter complex) and then final recognition (lesion recognition complex) [53]. These observations indicate that the discrimination between a normal G and an 8-oxoG must occur after the flipping out of the base. As mentioned earlier, G and 8-oxoG only differ by the addition of a hydrogen at position N7 and an oxygen at position 8 (Figure 1). The structure of the active site mutant OGG1(K249Q) with an 8-oxoG in its catalytic pocket suggested that there is no direct contact of the enzyme with the 8-oxo group. Therefore, the formation of a hydrogen bond between N7H and Gly42 was proposed to favour the retention of the damaged base, while its absence in the case of a normal guanine would result in the rejection of the base from the exosite. More recent work suggests that Lys249 is indispensable for 8-oxoG final alignment in the catalytic pocket, probably through interaction with O8 in the oxidized base [40]. Molecular dynamic simulations together with pre-steady-state fluorescence kinetics support the role of residues Lys249 and Asp268 in the correct positioning of 8-oxoG suitable for the catalytic hydrolysis of the N-glycosidic bond [54]. Specific contacts with the estranged C opposite the lesion provide a mean for OGG1 to discriminate against the processing of 8-oxoG paired with other bases [46].

The paragraph above described the requirements for OGG1 recognition of 8-oxoG once the enzyme is bound to the DNA at the site of the lesion. However, before reaching that point OGG1 has to scan the DNA. In the case of DNA glycosylases, the mechanism invoked is that of facilitated diffusion by which DNA binding proteins stochastically bind and diffuse along DNA to locate their target [55].

DNA glycosylases do not consume biochemical energy to drive their diffusion, their scanning of the DNA is therefore thermally activated and unbiased in its direction. For 1D diffusion along DNA, two options exist: sliding, by which the protein undergoes diffusion while remaining bound to the DNA, and hopping, referring to a repeated dissociation and rebinding at a new nearby location (Figure 2) [55,56]. Early single molecule experiments on stretched DNA (1D search) suggested that OGG1 slides in persistent contact with DNA [50]. They showed that it does so with a diffusion constant approaching the theoretical upper limit for one-dimensional diffusion, allowing OGG1 to scan up to 1 kb in 0.1 s at nearly physiological pH and salt concentration. Single-molecule diffusion data indicated that this rapid sliding is coupled to rotation to keep the DNA binding interface of the protein in constant contact with DNA [57]. More recent experiments using higher sampling rates [58] confirmed that the main mode of diffusion for OGG1 on DNA is helical sliding. Single molecule studies on the bacterial Nth, Nei, Fpg, and MutY have recently showed that these DNA glycosylases involved in the repair of oxidative DNA damage also scan for their cognate lesions at rates consistent with random rotational diffusion along the DNA backbone [59,60]. Interestingly, the values of activation energy obtained using instantaneous diffusion rate results are consistent with OGG1 examining flipped-out bases one by one. While the initial in vitro data suggested OGG1 sliding along DNA could occur over length scales of hundreds of bases, in cells the enzyme will be most probably forced to dissociate once it reaches inaccessible stretches of DNA occluded by bound proteins, thus alternating hopping and sliding modes. This scenario is further supported by observations using the high-resolution molecular clock method showing that OGG1 sliding on DNA actually occurs by microscopic 2D and 3D hopping steps [61]. The behaviour of the protein will thus depend on the degree of DNA compaction, the concentration of the enzyme and the molecular crowding. The relatively short mean sliding length calculated [50,61] seems compatible with searching short segments of DNA accessible within the cell. This Brownian target search provides high redundancy in the search for the modified base. Interestingly, three DNA glycosylases required for the removal of oxidised bases in *E. coli* were shown to scan along the DNA in a manner similar to that of OGG1. All moved randomly in both directions and scanned repeatedly over a single area of DNA with high redundancy [62].

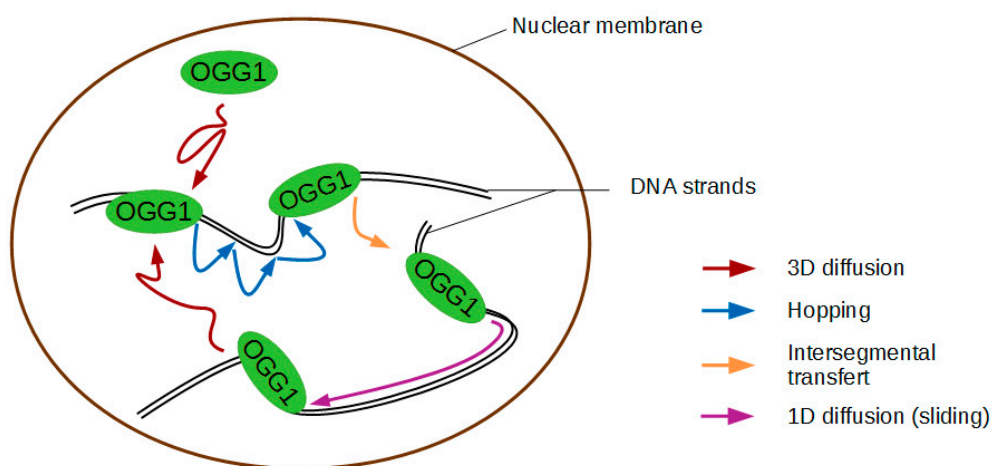


Figure 2. Proposed OGG1 diffusion modes.

2.2. Impact of the Nucleosome on 8-oxoG Excision by OGG1

DNA organisation in chromatin represents a challenge for DNA repair enzymes [63,64]. This can be particularly true in the case of OGG1 search for its cognate lesion, 8-oxoG, that does not create a significant distortion of the helix, therefore unlikely to affect the chromatin context in its surroundings. The high level of compaction of the genome and the presence of proteins bound to the DNA would act as barriers for the scanning by OGG1.

The first level of chromatin organisation is the nucleosome core particle in which 147 base pairs of DNA are wrapped around a histone octamer. Compared to the naked DNA substrate, the excision activity of the two major human uracil DNA glycosylases, UNG2 and SMUG1, is decreased by 3- to 9-fold when the uracil-containing DNA is wrapped around a nucleosome core particle [65]. While in this study the reduction of uracil removal was independent of the position of the lesion within the core particle, a later report showed that the inhibition of the glycosylase was more pronounced when the uracil faced towards the histones [66].

Similarly, while OGG1-mediated excision of an 8-oxoG embedded in a reconstituted nucleosome can be facilitated by spontaneous and transient unwrapping of DNA from the histones [67], the efficiency is reduced when compared to that on a naked DNA substrate [68]. Incubation of the same nucleosome substrate with the chromatin remodeller SWI/SNF relieved this inhibition. The same authors showed that removal of 8-oxoG present within the linker DNA is impaired by the presence of histone H1 [69]. Based on these observations, it was suggested that *in vivo* chromatin remodellers or histone chaperones are required for efficient 8-oxoG repair in the cell. Nevertheless, in such *in vitro* reconstituted chromatin substrates, any biochemical activity disturbing the nucleosome structure might increase the exposure of the lesion, thus promoting its excision. This is not necessarily true in the context of a fully folded genome and therefore further experiments are required to prove the need for these factors for efficient 8-oxoG removal in living cells.

2.3. Mechanisms Triggering the Recruitment of OGG1 to 8-oxoG Lesions in the Nuclear Context

Another level of complexity is reached when we consider that OGG1 has to find the 8-oxoG in the extremely dense nuclear environment. In this context, OGG1 has to deal not only with chromatin architecture, but also with a plethora of other proteins involved in replication, transcription and DNA repair that also explore the nuclear space to find their targets. In unchallenged cells, OGG1 is mostly present in the nucleoplasm soluble fraction and is extremely dynamic [70–72]. Our experiments showed that upon treatment with oxidizing agents such as KBrO_3 or H_2O_2 , which generate 8-oxoG in the cellular DNA, a fraction of OGG1 becomes insoluble due to its recruitment or retention at the chromatin (Figure 3a) [70]. This results in a decrease in OGG1 nuclear mobility assessed by fluorescence redistribution after photoperturbation (FRAP) experiments [71–73]. Experiments performed in our laboratory demonstrated that OGG1 is recruited in a PARP independent manner within a few seconds to the region of damage after local induction of 8-oxoG lesions by laser microirradiation (Figure 3b) [69,71,74]. The time of retention of OGG1 in the chromatin fraction correlates with the repair kinetics of the 8-oxoG [70,71]. Surprisingly, the OGG1(F319A) mutant that is deficient in the recognition of 8-oxoG, is also recruited to the chromatin fraction in KBrO_3 treated cells [70]. This intriguing result suggests that OGG1 recruitment to the sites of damage is not triggered by the detection of the modified base by the glycosylase. In the sections below, we will describe the additional mechanisms that are proposed to contribute to the efficient accumulation of OGG1 at the sites of oxidative DNA damage.

2.3.1. Efficient Recruitment of OGG1 to Chromatin Is Promoted by Several Cofactors

One of the earliest proteins recruited upon DNA damage induction is poly-ADP-ribose (PAR) polymerase 1 (PARP1) which signals DNA damage by adding PAR chains to the surroundings proteins, mostly histones and PARP1 itself, increasing chromatin accessibility [75,76]. Although several reports suggest a role of PARP1 in BER, it seems to be mostly linked to the processing of intermediates of the pathway and not to the initiation step mediated by DNA glycosylases. Indeed, it was shown that PARylation is not required for recruitment of OGG1 to the chromatin fraction upon oxidative stress or laser induced 8-oxoG [71].

Proteins from the NER pathway specialized in the repair of bulky DNA lesions facilitate the repair of 8-oxoG and other oxidised bases. In most cases, it is by the stimulation of the BER enzymes but it has also been suggested that they could participate in chromatin remodelling and thus facilitate the access of other repair factors [77]. UV-DDB1, a NER damage sensor has been implicated in the BER of 8-oxoG.

UV-DDB1 is recruited to 8-oxoG induced at telomeres where it interacts and stimulates the enzymatic activity of OGG1, MYH, and APE1 (which cleave adenine paired to 8-oxoG, and processes the AP site, respectively) and may thus be involved in the orchestration of the first steps of BER [78]. However, because UV-DDB1 affinity for an 8-oxoG:C pair is much lower than that of OGG1 [79], it is unlikely that it can act as the damage recognition for the oxidized guanine. Beyond the role of UV-DDB1 in BER, a larger cooperation and interplay between BER and NER has been well documented [80]. XPC was the first NER protein shown to have a role in BER of 8-oxoG via its ability to interact with OGG1 and stimulate its activity [81]. Later on, XPC and CSB were shown to be recruited to laser micro-irradiation induced 8-oxoG [69,82] and a reduced efficiency in the removal of 8-oxoG was observed in cells deficient in CSB, XPA, and XPC, all three NER proteins [83].

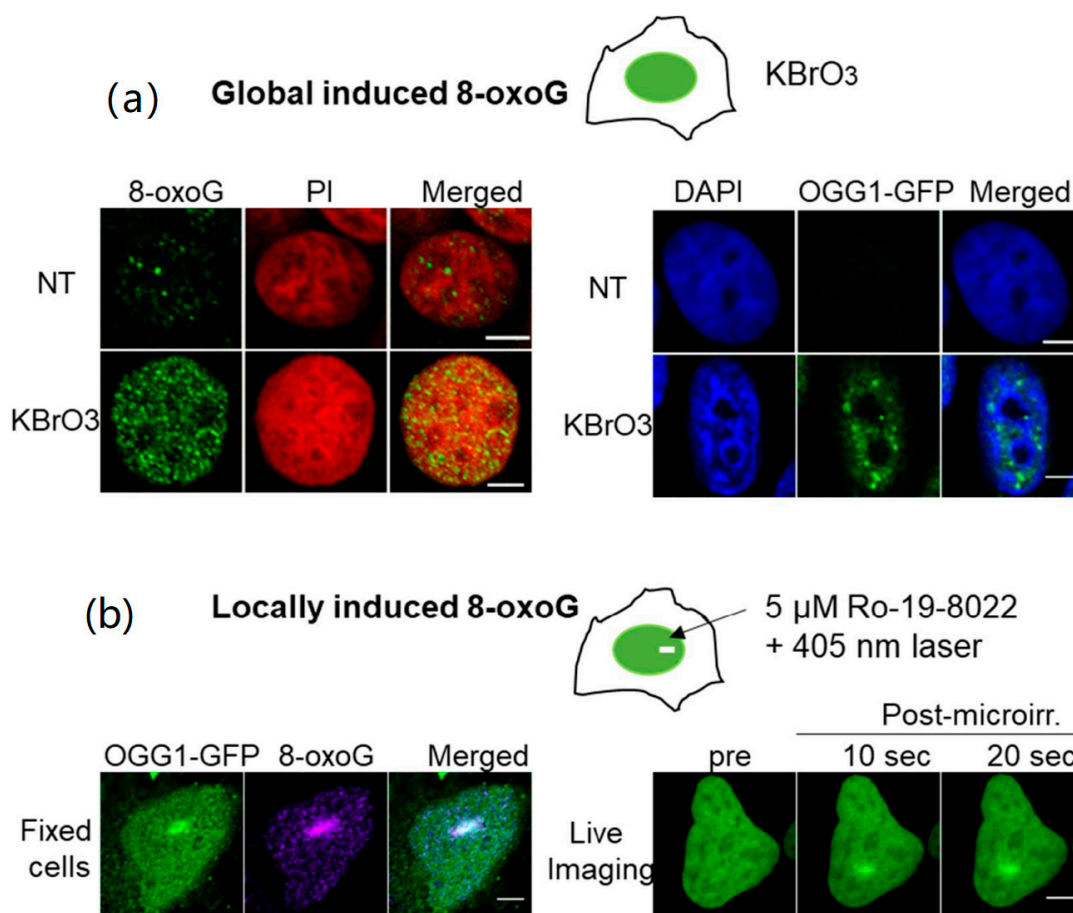


Figure 3. Induction of 8-oxoG and recruitment of OGG1-GFP to chromatin. (a) Exposure of cells to KBrO_3 results in a global induction of 8-oxoG in the nuclear genome leading to recruitment of OGG1 to chromatin. Left panel: 8-oxoG was detected using a specific antibody against the lesion (green) and DNA was stained with PI (red). Right panel: The fusion of OGG1 to the fluorescent protein GFP (green), allows following the distribution of the protein in untreated cells or cells exposed to KBrO_3 . The soluble fraction was extracted before imaging to detect the association of the protein with chromatin. Nuclear DNA was stained with DAPI (blue). Scale bars: 5 μm . (b) Recruitment of OGG1-GFP to 8-oxoG induced by laser micro-irradiation. Left panel: The antibody against 8-oxoG (magenta) reveals the formation of the lesion at the same regions where OGG1-GFP (green) was recruited. Right panel: Recruitment of OGG1-GFP in real time by live-cell imaging. Scale bars: 5 μm .

Another indication of the possible crosstalk between 8-oxoG BER and other DNA repair mechanisms is the interaction between OGG1 and hSSB1, a protein involved in the repair of double strand breaks by homologous recombination. hSSB1 re-localises to the chromatin fraction upon

cell exposure to H₂O₂ and is required for the retention of OGG1 on chromatin and the excision of 8-oxoG [84]. In vitro, hSSB1 can interact with a dsDNA containing an 8-oxoG and can mediate the binding of the OGG1(F319A) mutant, that, as mentioned before, has no affinity for the lesion. Those results could explain the recruitment of the OGG1(F319A) to the chromatin fraction that has been observed after exposure of the cells to KBrO₃ [70] and thus hSSB1 could act as an additional sensor of damage, guiding OGG1 to the damaged base in specific contexts.

Recently, a high throughput siRNA screening identified 81 proteins whose depletion leads to reduced OGG1 recruitment to chromatin in cells exposed to oxidative stress [72]. Besides proteins already known to be associated with BER, such as UV-DDB1, this work also revealed that several subunits of cohesin and mediator complexes, mostly known for their roles in genome organization [85] and transcriptional regulation [86], contribute to OGG1 recruitment to DNA lesions and facilitate 8-oxoG removal. The involvement of cohesin and mediator complexes in BER, together with their previously known roles in DNA repair of DSB and UV-induced damage, respectively, indicates a major role of these complexes for the maintenance of genomic stability [87–90].

2.3.2. Potential Role of Post-Translational Modifications in OGG1 Nuclear Dynamics

Several post-translational modifications have been reported for OGG1 and could regulate the affinity of this protein for specific chromatin regions either directly or through cofactors that remain to be identified. Notably, it has been shown that lysine residues in the C-terminal part of OGG1 can be acetylated both in vitro and in vivo by p300. Acetylated OGG1 reduces the affinity of the enzyme for the AP site it generates, increasing its turnover with the consequent enhancement of the 8-oxoG DNA glycosylase activity [91]. Interestingly, histones were the first identified targets of the p300/CBP complex, their acetylation resulting in chromatin relaxation required for transcriptional initiation. The p300/CBP complex is known to acetylate many proteins involved in transcription, DNA replication, and repair, including several BER factors. The DNA glycosylase TDG, responsible for the removal of thymine or uracil mispaired with guanine, commonly associated to CpG islands, is also regulated by p300/CBP. A direct interaction between CBP and TDG was reported and the complex retains both enzymatic activities for DNA repair and transcriptional activation and could thus be considered as a molecular switch to coordinate DNA repair and transcriptional functions [92]. It is worth noting that oxidative stress increases the levels and activity of p300 as well as the levels of acetylated OGG1 [91]. Besides acetylation, it was also reported that several kinases, such as protein kinase C (PKC), cyclin dependent kinase 4 (CDK4), and c-Abl, can phosphorylate OGG1 [93,94]. Phosphorylated OGG1 was shown to be enriched in the chromatin fraction, suggesting that this post-translational modification could modulate the subcellular localization of the enzyme [94].

It is important to keep in mind that post-translational modifications contributing to the arrival or retention of OGG1 at the chromatin could not only alter OGG1 but potentially any other partner. In particular, the post-translational modification of proteins such as cohesin or mediator could provide the signals for attracting OGG1 to regions where DNA is accessible to initiate the scanning process. Further studies are required to have a clearer picture of the post-translational modifications involved in the modulation of OGG1 nuclear distribution upon the induction of 8-oxoG.

2.4. Preferential Recruitment of OGG1 to Open Chromatin Regions: A Link with Transcription?

Chromatin is not homogeneously packed within the nucleus and dense regions (heterochromatin) can be distinguished from less compacted ones (euchromatin). Euchromatin is usually associated with active transcription and is thought to be more accessible to proteins.

Upon treatment of cells with oxidizing agents inducing global genome damage, OGG1 is specifically retained in euchromatin regions and clearly excluded from heterochromatin [70]. One possible explanation for the absence of OGG1 in heterochromatic regions could be that their highly compacted structure protects the DNA against oxidation by ROS, reducing the load of 8-oxoG in those regions. However, there is no reason to think that small ROS molecules are unable to reach DNA in

heterochromatin [95]. Conversely, the better accessibility of euchromatin could favour those regions as access points for DNA scanning by OGG1. The fact that the mediator and cohesin complexes, which associate with transcriptionally-active genomic area, contribute to OGG1 recruitment to chromatin may also explain the uneven distribution of this glycosylase within the nucleus. The low packing-state and the nucleosome-depletion observed in these euchromatin domains may also facilitate DNA scanning by OGG1 and 8-oxoG clearance [96]. This would be in agreement with the localisation of 8-oxoG that is not randomly distributed in the genome, being detectable at lower levels in genic regions compared to gene deserts [97]. Interestingly, lower levels of 8-oxoG were observed in highly transcribed genes, suggesting a better repair efficiency on those regions [98]. This observation is also consistent with the fact that OGG1 recruitment and assembly of BER complexes occur preferentially in euchromatin regions linked with active transcription [70].

The levels of 8-oxoG in cellular DNA are often used as a biomarker of oxidative stress exposure. Even though 8-oxoG is primarily considered as a base lesion, and its repair by the BER as a mean to avoid mutations, an interesting emerging concept is that due to its high sensitivity to oxidation, guanine in DNA could act as an oxidative stress sensor. Vertebrate genomes are known to be biased in terms of GC content and many promoters of genes coding for stress-response proteins display a high GC content and are particularly sensitive to oxidation [99]. The induction of 8-oxoG at specific sites of the genome, together with its processing by BER, allows the regulation of transcription of certain genes [100,101]. Consistently, recent mapping of the presence of 8-oxoG performed at high resolution showed an enrichment of 8-oxoG in promoters and regulatory regions [99]. Several mechanisms of transcription regulation involving the faithful repair of 8-oxoG at regulatory sequences have been proposed. They include the direct recruitment of transcription factors by BER proteins or repair intermediates, or the stabilization of G-quadruplex structures which in turn drive the recruitment of transcriptional activators [102–104]. Furthermore, the use of recently identified OGG1 inhibitors showed that OGG1 activity is required for nuclear factor κ B occupancy of its DNA binding sites and proinflammatory gene expression [73]. Those interesting observations place 8-oxoG and OGG1, together with other BER actors, at the crossroad between repair and transcriptional regulation. Further studies are required to better understand this duality and to conciliate the fact that 8-oxoG is at the same time a lesion that hinders genome instability and a signal for the fine-tuning of essential transcription programs.

3. Open Questions Regarding the Influence of the Nuclear Environment on OGG1 Functions

As shown in the above sections of this review, the description of the mechanisms of 8-oxoG detection and cleavage by OGG1 along the DNA has now reached a high degree of precision. We have also progressed in the understanding of the roles of co-factors as well as the local chromatin landscape in regulating OGG1 repair activity. There is nevertheless one aspect of this process that remains poorly characterized. That is the impact of the global nuclear environment on the ability of OGG1 to find 8-oxoG lesions within the genome. Indeed, in a context where targets such as for DNA lesions are rare and spread throughout the nucleus, the duration of the diffusive search process might be much longer than the biochemical reaction carried out by the protein on its target. This category of reaction kinetics, often referred to as diffusion-limited, appears widespread among nuclear proteins [105]. Therefore, it is essential to identify the features of the nuclear environment that influence its exploration by OGG1 as well as the strategies developed by this protein to maximize the efficiency of this diffusive searching process.

3.1. Does Macromolecular Crowding Facilitate or Impair OGG1 Dynamics within the Nucleus?

Like any nuclear protein searching for a specific target within the nucleus, OGG1 needs to navigate a highly crowded nucleus. An environment is defined as crowded when the macromolecules that are present occupy a significant proportion of the available space. In the nucleus, the main crowding agent is thought to be the chromatin, which occupies 20–40% of the nuclear volume [106]. Because of this

high fraction of inaccessible volume, the concentration of other macromolecules is reduced compared to a dilute environment. Besides this so-called volume exclusion effect, crowding is also predicted to dramatically slow down protein diffusion and shift intermolecular reaction equilibria towards the bound state [107].

While in dormant cells crowding seems to play a major role in shutting down key intracellular processes [108], in active cycling cells the contribution of crowding appears less dramatic than predicted by theoretical work. Nevertheless, for tracers of sizes similar to OGG1 a reduction of local concentration of a factor of 1.5 and a slowing-down of diffusion by about 2-fold were reported in dense heterochromatin foci compared to euchromatin [95,109]. Furthermore, chromatin-interacting proteins showing no specificity for histone marks or DNA sequence were shown to be trapped in heterochromatin, probably due to increased binding promoted by crowding [109]. Since these effects are generic, they will also impact OGG1 dynamics and could therefore at least partially explain the differences in behaviour reported for this protein in heterochromatin compared to euchromatin areas [70,72]. Based on in vitro experiments, it was reported that crowding helps to maintain OGG1 nearby the DNA during the scanning of the DNA by consecutive hopping steps [110]. This effect of crowding might actually compensate for the negative impact of the intracellular ionic conditions on OGG1 motion along the DNA [110]. Therefore, by promoting low-dimensionality diffusion phases, crowding could actually accelerate the search phase of repair factors [111]. Nevertheless, theoretical work demonstrates that efficient search by facilitated diffusion requires a trade-off between 1D and 3D diffusion phases [112]. An imbalance in OGG1 facilitated diffusion towards long 1D-sliding phases due to high crowding conditions could ultimately decrease the search efficiency for rare 8-oxoG targets.

3.2. How Much Time Does It Take to Find an 8-oxoG Lesion within the Complex Architecture of the Nucleus?

The efficiency of target-search processes has been characterised by two main estimators: the mean first passage time, which estimates the time required for a first encounter between the searcher and its target [113], and the cover time, which estimates the time needed for an exhaustive search in a given area [114]. An interesting finding in the context of DNA repair factors is that target-search strategies minimizing the cover time also optimize the mean first passage time [114], indicating that an efficient and exhaustive scan of the DNA required to avoid leaving some lesions unrepaired is not incompatible with a rapid detection of the lesions. Experimental data assessing these parameters in living cells are unfortunately very sparse. By recording the individual trajectories of DNA ligase and DNA polymerase I in bacteria treated with DNA-damaging agents, Uphoff and colleagues could estimate search times ranging from 10 to 60 s for these two late BER actors [115]. These proteins recognise gaps or nicks along the DNA double-helix, two types of lesions that will have a strong impact on the local conformation of the DNA [116], potentially facilitating the search process. This does not hold true for an 8-oxoG DNA glycosylase, since the cognate lesion has minimal impact on the DNA structure [18] and therefore, the characteristic search time of this protein might be significantly different from the one measured for the ligase or the polymerase.

Besides the time required to find a given target, another more qualitative characteristic of the search process relates to the mode of exploration, which can be either compact or non-compact [117]. In a compact exploration mode, the protein will perform a local exhaustive search, with multiple re-binding events to the same locations. In contrast, non-compact exploration corresponds to a more distant and sparse search which leaves lots of potential binding sites unvisited (Figure 4). Assessing the mode of exploration of nuclear proteins appears crucial since the degree of compactness of the search process is probably related to the biological needs. Analyses of the trajectories of individual transcription factors navigating the nucleus of living mammalian cells have shown that these proteins can actually display opposite exploration strategies [118,119], which were proposed to correspond to different requirements regarding transcription control. For repair proteins, the use of compact exploration would ensure scanning of all DNA and avoid leaving some lesions unrepaired. The published in vitro data suggest that the characteristics of the facilitated diffusion mechanism used by OGG1 leads to high redundancy

of the search process, reminiscent of compact exploration processes [61]. Nevertheless, a confirmation of this behaviour in living cells by the tracking of individual fluorescently-tagged OGG1 is still missing.

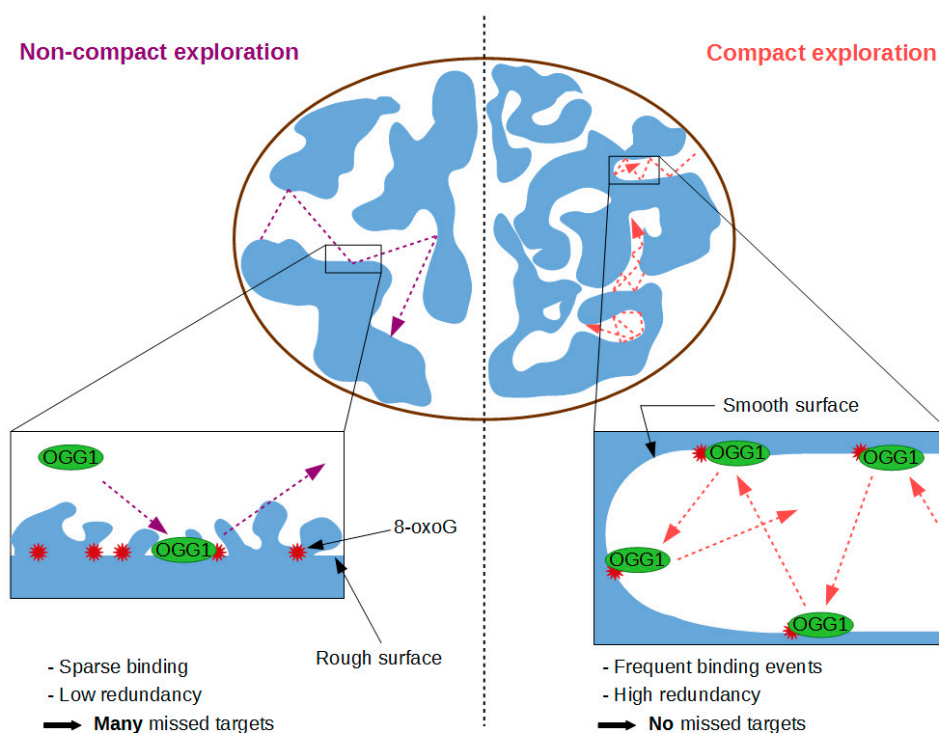


Figure 4. Compact versus non-compact exploration modes in target search.

Importantly, theoretical work indicates that the compactness of a search process, and therefore its redundancy, is not solely governed by the way nuclear proteins diffuse within the nucleus but also strongly depends on the spatial architecture of the chromatin [120,121]. In line with these predictions, experimental work has shown that compact exploration is favoured in heterochromatin domains compared to euchromatin regions [109,122]. It would be interesting to test whether this behaviour is also observed for OGG1, since it would imply more oversampling of the DNA in heterochromatin, which could eventually compensate for the reduced accessibility of these highly crowded areas.

3.3. Does Facilitated Diffusion of OGG1 Indeed Occur in the Cell Nucleus?

A very efficient way to speed-up the target-search along the DNA is to use facilitated diffusion for which 3D diffusion phases alternate with exploration at lower dimensionality along the DNA [123]. Nevertheless, to ensure that the search mechanism is not only fast but also highly specific, the proteins must display at least two binding states on the DNA, a transient one responsible for fast scanning and a more stable one associated with the recognition of a specific target [124]. A fast transition between these two binding states appears crucial to overcome the so-called speed/stability paradox [125]. Abundant in vitro data demonstrate that a large spectrum of repair proteins fulfil these different requirements to ensure an efficient clearing of DNA lesions [126,127]. OGG1 is no exception to the rule since its complex scanning process along the DNA described earlier in this review is supposed to allow the rapid and specific detection of the 8-oxoG [128]. Nevertheless, there is a huge gap between our precise understanding of these mechanisms of facilitated diffusion in in vitro reconstituted assays and their actual poor description in a living cell context. Yet, abundant evidence indicates that the high density of the nuclear environment and its ionic conditions may actually significantly impact the efficiency of the facilitated diffusion kinetics observed in a more dilute environment [110,111,129].

In fact, only few papers actually directly show that transcription or repair factors can diffuse along the DNA in living cells [130,131]. Instead, a nearly systematic observation reported in the recent works

characterizing the motions of nuclear proteins at the single molecule level is that 3D diffusion alternates with transient nonspecific trapping of the proteins along the DNA [132–134]. The characteristic lifetime of these transient interactions appears to be usually extremely short, i.e., below few tens of milliseconds [135,136]. Nevertheless, for some transcription factors, a wide distribution of nonspecific binding times largely overlapping with the characteristic durations of the specific binding events was also reported [137]. A hypothesis to explain these long non-specific trapping periods would be that proteins get confined within small nuclear areas in which they perform consecutive short transient binding that cannot be resolved by the limited resolution of the current single molecule techniques used in living cells [138]. This behaviour could actually correspond to short hopping steps from one DNA chain to another, a process known as intersegmental transfer which was observed in vitro for several transcription and repair factors [127,139,140] (Figure 2). Therefore, even if proper scanning along the DNA may not actually occur within the nuclear context, such local consecutive hopping may transiently lower the dimensionality of the exploration phase, which could be sufficient to speed-up the search process similarly to rigorous facilitated diffusion [141]. OGG1 could actually follow such dynamics since it seems to perform associative 1D sliding only for very short DNA stretches of few nucleotides and rather move along the DNA via hopping [61]. Further analysis of the single-molecule trajectories displayed in living cells by wild-type OGG1 and mutants unable to recognize 8-oxoG should allow a better understanding of how the fine tuning of this multidimensional exploration of the nuclear space promotes the rapid and specific detection of the 8-oxoG lesions along the genome.

Funding: Research in our laboratory was funded by a grant from the Fondation ARC (PJA 20181207762) and by the CEA Radiobiology Programme. O.D'A. was supported by a PhD fellowship from the Région Bretagne and the CEA.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Marnett, L.J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 361–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Cadet, J. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2003**, *531*, 5–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Gedik, C.M.; Collins, A. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: Results of an interlaboratory validation study. *FASEB J.* **2005**, *19*, 82–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ohno, M.; Miura, T.; Furuichi, M.; Tominaga, Y.; Tsuchimoto, D.; Sakumi, K.; Nakabeppu, Y. A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. *Genome Res.* **2006**, *16*, 567–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kasai, H.; Tanooka, H.; Nishimura, S. Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation. *Gan* **1984**, *75*, 1037–1039.
6. Neeley, W.L.; Essigmann, J.M. Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 491–505. [[CrossRef](#)]
7. Hall, D.B.; Holmlin, R.E.; Barton, J.K. Oxidative DNA damage through long-range electron transfer. *Nature* **1996**, *382*, 731–735. [[CrossRef](#)]
8. Lopez-Otin, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **2013**, *153*, 1194–1217. [[CrossRef](#)]
9. Sampath, H.; McCullough, A.K.; Lloyd, R.S. Regulation of DNA glycosylases and their role in limiting disease. *Free Radic. Res.* **2012**, *46*, 460–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Sheng, Z.; Oka, S.; Tsuchimoto, D.; Abolhassani, N.; Nomaru, H.; Sakumi, K.; Yamada, H.; Nakabeppu, Y. 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during MUTYH-mediated DNA base excision repair. *J Clin. Investig.* **2012**, *122*, 4344–4361. [[CrossRef](#)]
11. Siddiqui, A.; Rivera-Sánchez, S.; Castro, M.D.R.; Acevedo-Torres, K.; Rane, A.; Torres-Ramos, C.A.; Nicholls, D.G.; Andersen, J.K.; Ayala-Torres, S. Mitochondrial DNA damage Is associated with reduced mitochondrial bioenergetics in Huntington's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 1478–1488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Ayala-Pena, S. Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *62*, 102–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bradley-Whitman, M.A.; Timmons, M.D.; Beckett, T.L.; Murphy, M.P.; Lynn, B.C.; Lovell, M.A. Nucleic acid oxidation: An early feature of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2014**, *128*, 294–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Golden, T.-R.; Melov, S. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and aging. *Mech. Ageing Dev.* **2001**, *122*, 1577–1589. [[CrossRef](#)]
15. Boiteux, S.; Coste, F.; Castaing, B. Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *107*, 179–201. [[CrossRef](#)]
16. Plum, G.E.; Grollman, A.P.; Johnson, F.; Breslauer, K.J. Influence of the Oxidatively Damaged Adduct 8-Oxodeoxyguanosine on the Conformation, Energetics, and Thermodynamic Stability of a DNA Duplex. *Biochemistry* **1995**, *34*, 16148–16160. [[CrossRef](#)]
17. Singh, S.K.; Szulik, M.W.; Ganguly, M.; Khutsishvili, I.; Stone, M.P.; Marky, L.A.; Gold, B. Characterization of DNA with an 8-oxoguanine modification. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 6789–6801. [[CrossRef](#)]
18. Lipscomb, L.A.; Peek, M.E.; Morningstar, M.L.; Verghis, S.M.; Miller, E.M.; Rich, A.; Essigmann, J.M.; Williams, L.D. X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 719–723. [[CrossRef](#)]
19. Oda, Y.; Uesugi, S.; Ikehara, M.; Nishimura, S.; Kawase, Y.; Ishikawa, H.; Inoue, H.; Ohtsuka, E. NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1407–1412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gannett, P.M.; Sura, T.P. Base pairing of 8-oxoguanosine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine with 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxycytosine, 2'-deoxyguanosine, and thymidine. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 690–700. [[CrossRef](#)]
21. Yudkina, A.V.; Shilkin, E.S.; Endutkin, A.V.; Makarova, A.V.; Zharkov, D.O. Reading and Misreading 8-oxoguanine, a Paradigmatic Ambiguous Nucleobase. *Crystals* **2019**, *9*, 269. [[CrossRef](#)]
22. Kitsera, N.; Stathis, D.; Luehnsdorf, B.; Mueller, H.; Carell, T.; Epe, B.; Khobta, A. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 5926–5934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kouchakdjian, M.; Bodepudi, V.; Shibutani, S.; Eisenberg, M.; Johnson, F.; Grollman, A.P.; Patel, D.J. NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn).cntdot.dA(anti) alignment at lesion site. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1403–1412. [[CrossRef](#)]
24. Shibutani, S.; Takeshita, M.; Grollman, A.P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation- damaged base 8-oxodG. *Nature* **1991**, *349*, 431–434. [[CrossRef](#)]
25. Hsu, G.W.; Ober, M.; Carell, T.; Beese, L.S. Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. *Nature* **2004**, *431*, 217–221. [[CrossRef](#)]
26. Grollman, A.P.; Moriya, M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: An enemy within. *Trends Genet* **1993**, *9*, 246–249. [[CrossRef](#)]
27. Saxowsky, T.T.; Meadows, K.L.; Klungland, A.; Doetsch, P.W. 8-Oxoguanine-mediated transcriptional mutagenesis causes Ras activation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18877–18882. [[CrossRef](#)]
28. Lindahl, T.; Karran, P.; Wood, R.D. DNA excision repair pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, *7*, 158–169. [[CrossRef](#)]
29. Lindahl, T.; Wood, R.D. Quality Control by DNA Repair. *Science* **1999**, *286*, 1897–1905. [[CrossRef](#)]
30. Krokan, H.E.; Bjoras, M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012583. [[CrossRef](#)]
31. van der Kemp, P.A.; Thomas, D.; Barbey, R.; de Oliveira, R.; Boiteux, S. Cloning and expression in Escherichia coli of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5197–5202. [[CrossRef](#)]
32. Nash, H.M.; Bruner, S.D.; Schäerer, O.D.; Kawate, T.; Addona, T.A.; Spooner, E.; Lane, W.S.; Verdine, G.L. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 968–980. [[CrossRef](#)]

33. Aburatani, H.; Hippo, Y.; Ishida, T.; Takashima, R.; Matsuba, C.; Kodama, T.; Takao, M.; Yasui, A.; Yamamoto, K.; Asano, M. Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 2151–2156.
34. Arai, K.; Morishita, K.; Shinmura, K.; Kohno, T.; Kim, S.R.; Nohmi, T.; Taniwaki, M.; Ohwada, S.; Yokota, J. Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* **1997**, *14*, 2857–2861. [[CrossRef](#)]
35. Bjoras, M. Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *EMBO J.* **1997**, *16*, 6314–6322. [[CrossRef](#)]
36. Lu, R.; Nash, H.M.; Verdine, G.L. A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 397–407. [[CrossRef](#)]
37. Radicella, J.P.; Dherin, C.; Desmaze, C.; Fox, M.S.; Boiteux, S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*. [[CrossRef](#)]
38. Roldán-Arjona, T.; Wei, Y.F.; Carter, K.C.; Klungland, A.; Anselmino, C.; Wang, R.P.; Augustus, M.; Lindahl, T. Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8016–8020. [[CrossRef](#)]
39. Rosenquist, T.A.; Zharkov, D.O.; Grollman, A.P. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7429–7434. [[CrossRef](#)]
40. Dalhus, B.; Forsbring, M.; Helle, I.H.; Vik, E.S.; Forstrøm, R.J.; Backe, P.H.; Alseth, I.; Bjørås, M. Separation-of-Function Mutants Unravel the Dual-Reaction Mode of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase. *Structure* **2011**, *19*, 117–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Vidal, A.E.; Hickson, I.D.; Boiteux, S.; Radicella, J.P. Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: Bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1285–1292. [[CrossRef](#)]
42. Hill, J.W. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: Potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 430–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Reardon, J.T.; Bessho, T.; Kung, H.C.; Bolton, P.H.; Sancar, A. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: Possible explanation for neurodegeneration in Xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 9463–9468. [[CrossRef](#)]
44. Bergeron, F.; Auvre, F.; Radicella, J.P.; Ravanat, J.L. HO^{*} radicals induce an unexpected high proportion of tandem base lesions refractory to repair by DNA glycosylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 5528–5533. [[CrossRef](#)]
45. David, S.S.; O’Shea, V.L.; Kundu, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* **2007**, *447*, 941–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bruner, S.D.; Norman, D.P.G.; Verdine, G.L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* **2000**, *403*, 859–866. [[CrossRef](#)]
47. Cheng, X.; Kelso, C.; Hornak, V.; de los Santos, C.; Grollman, A.P.; Simmerling, C. Dynamic Behavior of DNA Base Pairs Containing 8-Oxoguanine. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13906–13918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Chen, L.; Haushalter, K.A.; Lieber, C.M.; Verdine, G.L. Direct visualization of a DNA glycosylase searching for damage. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 345–350. [[CrossRef](#)]
49. Banerjee, A.; Yang, W.; Karplus, M.; Verdine, G.L. Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA. *Nature* **2005**, *434*, 612–618. [[CrossRef](#)]
50. Blainey, P.C.; Van Oijen, A.M.; Banerjee, A.; Verdine, G.L.; Xie, X.S. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5752–5757. [[CrossRef](#)]
51. Crenshaw, C.M.; Nam, K.; Oo, K.; Kutchukian, P.S.; Bowman, B.R.; Karplus, M.; Verdine, G.L. Enforced Presentation of an Extrahelical Guanine to the Lesion Recognition Pocket of Human 8-Oxoguanine Glycosylase, hOGG1. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 24916–24928. [[CrossRef](#)]
52. Li, H.; Endutkin, A.V.; Bergonzo, C.; Fu, L.; Grollman, A.; Zharkov, D.O.; Simmerling, C. DNA Deformation-Coupled Recognition of 8-Oxoguanine: Conformational Kinetic Gating in Human DNA Glycosylase. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2682–2692. [[CrossRef](#)]

53. Kuznetsov, N.A.; Koval, V.V.; Nevinsky, G.A.; Douglas, K.T.; Zharkov, D.O.; Fedorova, O.S. Kinetic Conformational Analysis of Human 8-Oxoguanine-DNA Glycosylase. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 1029–1038. [[CrossRef](#)]
54. Tyugashev, T.E.; Vorobjev, Y.N.; Kuznetsova, A.A.; Lukina, M.V.; Kuznetsov, N.A.; Fedorova, O.S. Roles of Active-Site Amino Acid Residues in Specific Recognition of DNA Lesions by Human 8-Oxoguanine-DNA Glycosylase (OGG1). *J. Phys. Chem.* **2019**, *123*, 4878–4887. [[CrossRef](#)]
55. Berg, O.G.; Winter, R.B.; Von Hippel, P.H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory. *Biochemistry* **1981**, *20*, 6929–6948. [[CrossRef](#)]
56. Riggs, A.D.; Bourgeois, S.; Cohn, M. The lac repressor-operator interaction. *J. Mol. Biol.* **1970**, *53*, 401–417. [[CrossRef](#)]
57. Blainey, P.C.; Luo, G.; Kou, S.C.; Mangel, W.F.; Verdine, G.L.; Bagchi, B.; Xie, X.S. Nonspecifically bound proteins spin while diffusing along DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 1224–1229. [[CrossRef](#)]
58. Ahmadi, A.; Rosnes, I.; Blicher, P.; Diekmann, R.; Schüttelz, M.; Glette, K.; Tørresen, J.; Bjørås, M.; Dalhus, B.; Rowe, A.D. Breaking the speed limit with multimode fast scanning of DNA by Endonuclease V. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5381. [[CrossRef](#)]
59. Lee, A.J.; Majumdar, C.; Kathe, S.D.; Van Ostrand, R.P.; Vickery, H.R.; Averill, A.M.; Nelson, S.R.; Manlove, A.H.; McCord, M.A.; David, S.S. Detection of OG: A Lesion Mispairs by MutY Relies on a Single His Residue and the 2-Amino Group of 8-Oxoguanine. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 13283–13287. [[CrossRef](#)]
60. Dunn, A.R.; Kad, N.M.; Nelson, S.R.; Warshaw, D.M.; Wallace, S.S. Single Qdot-labeled glycosylase molecules use a wedge amino acid to probe for lesions while scanning along DNA. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 7487–7498. [[CrossRef](#)]
61. Rowland, M.M.; Schonhofs, J.D.; McKibbin, P.L.; David, S.S.; Stivers, J.T. Microscopic mechanism of DNA damage searching by hOGG1. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 9205–9303. [[CrossRef](#)]
62. Lee, A.J.; Wallace, S.S. Hide and seek: How do DNA glycosylases locate oxidatively damaged DNA bases amidst a sea of undamaged bases? *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *107*, 170–178. [[CrossRef](#)]
63. Smerdon, M.J. DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1991**, *3*, 422–428. [[CrossRef](#)]
64. Green, C.M.; Almouzni, G. When repair meets chromatin. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 28–33. [[CrossRef](#)]
65. Nilsen, H.; Lindahl, T.; Verreault, A. DNA base excision repair of uracil residues in reconstituted nucleosome core particles. *EMBO J.* **2002**, *21*, 5943–5952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Beard, B.C.; Wilson, S.H.; Smerdon, M.J. Suppressed catalytic activity of base excision repair enzymes on rotationally positioned uracil in nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7465–7470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Bilotti, K.; Kennedy, E.E.; Li, C.; Delaney, S. Human OGG1 activity in nucleosomes is facilitated by transient unwrapping of DNA and is influenced by the local histone environment. *DNA Repair* **2017**, *59*, 1–8. [[CrossRef](#)]
68. Menoni, H.; Gasparutto, D.; Hamiche, A.; Cadet, J.; Dimitrov, S.; Bouvet, P.; Angelov, D. ATP-Dependent Chromatin Remodeling Is Required for Base Excision Repair in Conventional but Not in Variant H2A.Bbd Nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 5949–5956. [[CrossRef](#)]
69. Menoni, H.; Hoeijmakers, J.H.J.; Vermeulen, W. Nucleotide excision repair-initiating proteins bind to oxidative DNA lesions in vivo. *J. Cell Biol.* **2012**, *199*, 1037–1046. [[CrossRef](#)]
70. Amouroux, R.; Campalans, A.; Epe, B.; Radicella, J.P. Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*. [[CrossRef](#)]
71. Campalans, A.; Kortulewski, T.; Amouroux, R.; Menoni, H.; Vermeulen, W.; Radicella, J.P. Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 3115–3129. [[CrossRef](#)]
72. Lebraud, E.; Pinna, G.; Siberchicot, C.; Depagne, J.; Busso, D.; Fantini, D.; Irbah, L.; Robeska, E.; Kratassiouk, G.; Ravanat, J.-L.; et al. Chromatin recruitment of OGG1 requires cohesin and mediator and is essential for efficient 8-oxoG removal. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 9082–9097. [[CrossRef](#)]
73. Visnes, T.; Cázares-Körner, A.; Hao, W.; Wallner, O.; Masuyer, G.; Loseva, O.; Mortusewicz, O.; Wiita, E.; Sarno, A.; Manoilov, A.; et al. Small-molecule inhibitor of OGG1 suppresses proinflammatory gene expression and inflammation. *Science* **2018**, *362*, 834–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. Lan, L.; Nakajima, S.; Wei, L.; Sun, L.; Hsieh, C.L.; Sobol, R.W.; Bruchez, M.; Van Houten, B.; Yasui, A.; Levine, A.S. Novel method for site-specific induction of oxidative DNA damage reveals differences in recruitment of repair proteins to heterochromatin and euchromatin. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 2330–2345. [[CrossRef](#)]
75. Ray Chaudhuri, A.; Nussenzweig, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 610–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Smith, R.; Lebeaupin, T.; Juhász, S.; Chapuis, C.; D'Augustin, O.; Dutertre, S.; Burkovics, P.; Biertümpfel, C.; Timinszky, G.; Huet, S. Poly(ADP-ribose)-dependent chromatin unfolding facilitates the association of DNA-binding proteins with DNA at sites of damage. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 11250–11267. [[CrossRef](#)]
77. Kumar, N.; Raja, S.; Van Houten, B. The involvement of nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **2020**, gkaa777. [[CrossRef](#)]
78. Jang, S.; Kumar, N.; Beckwitt, E.C.; Kong, M.; Fouquerel, E.; Rapić-Otrin, V.; Prasad, R.; Watkins, S.C.; Khuu, C.; Majumdar, C.; et al. Damage sensor role of UV-DDB during base excision repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2019**, *26*, 695–703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. van der Kemp, P.A.; Charbonnier, J.B.; Audebert, M.; Boiteux, S. Catalytic and DNA-binding properties of the human Ogg1 DNA N-glycosylase/AP Iyase: Biochemical exploration of H270, Q315 and F319, three amino acids of the 8-oxoguanine-binding pocket. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 570–578. [[CrossRef](#)]
80. Kumar, N.; Moreno, N.C.; Feltes, B.C.; Menck, C.F.; Van Houten, B.; Kumar, N.; Moreno, N.C.; Feltes, B.C.; Menck, C.F.; Houten, B. Cooperation and interplay between base and nucleotide excision repair pathways: From DNA lesions to proteins. *Genet. Mol. Biol.* **2020**, *43*. [[CrossRef](#)]
81. D'Errico, M.; Parlanti, E.; Teson, M.; De Jesus, B.M.B.; Degan, P.; Calcagnile, A.; Jaruga, P.; Bjørås, M.; Crescenzi, M.; Pedrini, A.M.; et al. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J.* **2006**, *25*, 4305–4315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Menoni, H.; Wienholz, F.; Theil, A.F.; Janssens, R.C.; Lans, H.; Campalans, A.; Radicella, J.P.; Marteijn, J.A.; Vermeulen, W. The transcription-coupled DNA repair-initiating protein CSB promotes XRCC1 recruitment to oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 7747–7756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Fortini, P.; Parlanti, E.; Sidorkina, O.M.; Laval, J.; Dogliotti, E. The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 15230–15236. [[CrossRef](#)]
84. Paquet, N.; Adams, M.N.; Leong, V.; Ashton, N.W.; Touma, C.; Gamsjaeger, R.; Cubeddu, L.; Beard, S.; Burgess, J.T.; Bolderson, E.; et al. HSSB1 (NABP2/OBFC2B) is required for the repair of 8-oxo-guanine by the hOGG1-mediated base excision repair pathway. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 8817–8829. [[CrossRef](#)]
85. Rao, S.S.P.; Huang, S.C.; Glenn St Hilaire, B.; Engreitz, J.M.; Perez, E.M.; Kieffer-Kwon, K.R.; Sanborn, A.L.; Johnstone, S.E.; Bascom, G.D.; Bochkov, I.D.; et al. Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains. *Cell* **2017**, *171*, 305–320.e24. [[CrossRef](#)]
86. Soutourina, J. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 262–274. [[CrossRef](#)]
87. Kim, J.S.; Krasieva, T.B.; LaMorte, V.; Malcolm, A.; Taylor, R.; Yokomori, K. Specific recruitment of human cohesin to laser-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 45149–45153. [[CrossRef](#)]
88. Eyboulet, F.; Cibot, C.; Eychenne, T.; Neil, H.; Alibert, O.; Werner, M.; Soutourina, J. Mediator links transcription and DNA repair by facilitating Rad2/XPG recruitment. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 2549–2562. [[CrossRef](#)]
89. Ström, L.; Lindroos, H.B.; Shirahige, K.; Sjögren, C. Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Mol. Cell* **2004**, *16*, 1003–1015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Dorsett, D.; Ström, L. The ancient and evolving roles of cohesin in DNA repair and gene expression. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, 240–250. [[CrossRef](#)]
91. Bhakat, K.K.; Mokkalapati, S.K.; Boldogh, I.; Hazra, T.K.; Mitra, S. Acetylation of Human 8-Oxoguanine-DNA Glycosylase by p300 and Its Role in 8-Oxoguanine Repair In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 1654–1665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Tini, M.; Benecke, A.; Um, S.J.; Torchia, J.; Evans, R.M.; Chambon, P. Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 256–277. [[CrossRef](#)]
93. Hu, J.; Imam, S.Z.; Hashiguchi, K.; de Souza-Pinto, N.C.; Bohr, V.A. Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase (α -OGG1) modulates its function. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3271–3282. [[CrossRef](#)]

94. Dantzer, F.; Luna, L.; Bjørås, M.; Seeberg, E. Human OGG1 undergoes serine phosphorylation and associates with the nuclear matrix and mitotic chromatin in vivo. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 2349–2357. [[CrossRef](#)]
95. Verschure, P.J.; van der Kraan, I.; Manders, E.M.M.; Hoogstraten, D.; Houtsmuller, A.B.; van Driel, R. Condensed chromatin domains in the mammalian nucleus are accessible to large macromolecules. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 861–866. [[CrossRef](#)]
96. Kagey, M.H.; Newman, J.J.; Bilodeau, S.; Zhan, Y.; Orlando, D.A.; van Berkum, N.L.; Ebmeier, C.C.; Goossens, J.; Rahl, P.B.; Levine, S.S.; et al. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* **2010**, *467*, 430–435. [[CrossRef](#)]
97. Yoshihara, M.; Jiang, L.; Akatsuka, S.; Suyama, M.; Toyokuni, S. Genome-wide profiling of 8-oxoguanine reveals its association with spatial positioning in nucleus. *DNA Res.* **2014**, *21*, 603–612. [[CrossRef](#)]
98. Amente, S.; Di Palo, G.; Scala, G.; Castrignanò, T.; Gorini, F.; Cocozza, S.; Moresano, A.; Pucci, P.; Ma, B.; Stepanov, I.; et al. Genome-wide mapping of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine reveals accumulation of oxidatively-generated damage at DNA replication origins within transcribed long genes of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 221–236. [[CrossRef](#)]
99. Ding, Y.; Fleming, A.M.; Burrows, C.J. Sequencing the Mouse Genome for the Oxidatively Modified Base 8-Oxo-7,8-dihydroguanine by OG-Seq. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2569–2572. [[CrossRef](#)]
100. Pastukh, V.; Roberts, J.T.; Clark, D.W.; Bardwell, G.C.; Patel, M.; Al-Mehdi, A.B.; Borchert, G.M.; Gillespie, M.N. An oxidative DNA “damage” and repair mechanism localized in the VEGF promoter is important for hypoxia-induced VEGF mRNA expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2015**, *309*, L1367–L1375. [[CrossRef](#)]
101. Sampath, H.; Lloyd, R.S. Roles of OGG1 in transcriptional regulation and maintenance of metabolic homeostasis. *DNA Repair* **2019**, *81*. [[CrossRef](#)]
102. Fleming, A.M.; Burrows, C.J. Interplay of Guanine Oxidation and G-Quadruplex Folding in Gene Promoters. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1115–1136. [[CrossRef](#)]
103. Fleming, A.M.; Ding, Y.; Burrows, C.J. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 2601–2609. [[CrossRef](#)]
104. Ba, X. Boldogh, Istvan 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 669–678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Beaudouin, J.; Mora-Bermúdez, F.; Klee, T.; Daigle, N.; Ellenberg, J. Dissecting the Contribution of Diffusion and Interactions to the Mobility of Nuclear Proteins. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1878–1894. [[CrossRef](#)]
106. Ou, H.D.; Phan, S.; Deerinck, T.J.; Thor, A.; Ellisman, M.H.; O'Shea, C.C. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* **2017**, *357*, eaag0025. [[CrossRef](#)]
107. Lebeaupin, T.; Smith, R.; Huet, S.; Timinszky, G. Poly(ADP-ribose)-dependent chromatin remodeling in DNA repair. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1608*, 165–183. [[CrossRef](#)]
108. Joyner, R.P.; Tang, J.H.; Helenius, J.; Dultz, E.; Brune, C.; Holt, L.J.; Huet, S.; Müller, D.J.; Weis, K. A glucose-starvation response regulates the diffusion of macromolecules. *Elife* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
109. Bancaud, A.; Huet, S.; Daigle, N.; Mozziconacci, J.; Beaudouin, J.; Ellenberg, J. Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J.* **2009**, *28*, 3785–3798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Cravens, S.L.; Stivers, J.T. Comparative Effects of Ions, Molecular Crowding, and Bulk DNA on the Damage Search Mechanisms of hOGG1 and hUNG. *Biochemistry* **2016**, *55*, 5230–5242. [[CrossRef](#)]
111. Dey, P.; Bhattacharjee, A. Mechanism of Facilitated Diffusion of DNA Repair Proteins in Crowded Environment: Case Study with Human Uracil DNA Glycosylase. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123*, 10354–10364. [[CrossRef](#)]
112. Winter, R.B.; Berg, O.G.; Von Hippel, P.H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 3. The Escherichia coli lac repressor-operator interaction: Kinetic measurements and conclusions. *Biochemistry* **1981**, *20*, 6961–6977. [[CrossRef](#)]
113. Coppey, M.; Bénichou, O.; Voituriez, R.; Moreau, M. Kinetics of Target Site Localization of a Protein on DNA: A Stochastic Approach. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1640–1649. [[CrossRef](#)]
114. Chupeau, M.; Bénichou, O.; Voituriez, R. Cover times of random searches. *Nat. Phys.* **2015**, *11*, 844–847. [[CrossRef](#)]
115. Uphoff, S.; Reyes-Lamothe, R.; Garza de Leon, F.; Sherratt, D.J.; Kapanidis, A.N. Single-molecule DNA repair in live bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8063–8068. [[CrossRef](#)]

116. Kashida, H.; Kurihara, A.; Kawai, H.; Asanuma, H. Orientation-dependent FRET system reveals differences in structures and flexibilities of nicked and gapped DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, e105. [[CrossRef](#)]
117. Bénichou, O.; Chevalier, C.; Klafter, J.; Meyer, B.; Voituriez, R. Geometry-controlled kinetics. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 472–477. [[CrossRef](#)]
118. Izeddin, I.; Récamier, V.; Bosanac, L.; Cissé, I.I.; Boudarene, L.; Dugast-Darzacq, C.; Proux, F.; Bénichou, O.; Voituriez, R.; Bensaude, O.; et al. Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus. *Elife* **2014**, *3*, e02230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Keizer, V.I.P.; Coppola, S.; Houtsmuller, A.B.; Geverts, B.; van Royen, M.E.; Schmidt, T.; Schaaf, M.J.M. Repetitive switching between DNA-binding modes enables target finding by the glucocorticoid receptor. *J. Cell Sci.* **2019**, *132*, jcs217455. [[CrossRef](#)]
120. Condamin, S.; Tejedor, V.; Voituriez, R.; Benichou, O.; Klafter, J. Probing microscopic origins of confined subdiffusion by first-passage observables. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5675–5680. [[CrossRef](#)]
121. Amitai, A. Chromatin Configuration Affects the Dynamics and Distribution of a Transiently Interacting Protein. *Biophys. J.* **2018**, *114*, 766–771. [[CrossRef](#)]
122. Knight, S.C.; Xie, L.; Deng, W.; Guglielmi, B.; Witkowsky, L.B.; Bosanac, L.; Zhang, E.T.; El Beheiry, M.; Masson, J.-B.; Dahan, M.; et al. Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science* **2015**, *350*, 823–826. [[CrossRef](#)]
123. von Hippel, P.H.; Berg, O.G. Facilitated target location in biological systems. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 675–678.
124. Mirny, L.; Slutsky, M.; Wunderlich, Z.; Tafvizi, A.; Leith, J.; Kosmrlj, A. How a protein searches for its site on DNA: The mechanism of facilitated diffusion. *J. Phys. A Math. Theor.* **2009**, *42*, 434013. [[CrossRef](#)]
125. Leven, I.; Levy, Y. Quantifying the two-state facilitated diffusion model of protein–DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 5530–5538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Esadze, A.; Stivers, J.T. Facilitated Diffusion Mechanisms in DNA Base Excision Repair and Transcriptional Activation. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 11298–11323. [[CrossRef](#)]
127. Howard, M.J.; Wilson, S.H. DNA scanning by base excision repair enzymes and implications for pathway coordination. *DNA Repair* **2018**, *71*, 101–107. [[CrossRef](#)]
128. Vestergaard, C.L.; Blainey, P.C.; Flyvbjerg, H. Single-particle trajectories reveal two-state diffusion-kinetics of hOGG1 proteins on DNA. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 2446–2458. [[CrossRef](#)]
129. Shvets, A.A.; Kolomeisky, A.B. Crowding on DNA in Protein Search for Targets. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 2502–2506. [[CrossRef](#)]
130. Hammar, P.; Leroy, P.; Mahmutovic, A.; Marklund, E.G.; Berg, O.G.; Elf, J. The lac Repressor Displays Facilitated Diffusion in Living Cells. *Science* **2012**, *336*, 1595–1598. [[CrossRef](#)]
131. Esadze, A.; Rodriguez, G.; Weiser, B.P.; Cole, P.A.; Stivers, J.T. Measurement of nanoscale DNA translocation by uracil DNA glycosylase in human cells. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 12413–12424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Stracy, M.; Jaciuk, M.; Uphoff, S.; Kapanidis, A.N.; Nowotny, M.; Sherratt, D.J.; Zawadzki, P. Single-molecule imaging of UvrA and UvrB recruitment to DNA lesions in living *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12568. [[CrossRef](#)]
133. Kapanidis, A.N.; Uphoff, S.; Stracy, M. Understanding Protein Mobility in Bacteria by Tracking Single Molecules. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 4443–4455. [[CrossRef](#)]
134. Woringer, M.; Darzacq, X. Protein motion in the nucleus: From anomalous diffusion to weak interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *46*, 945–956. [[CrossRef](#)]
135. White, M.D.; Angiolini, J.F.; Alvarez, Y.D.; Kaur, G.; Zhao, Z.W.; Mocskos, E.; Bruno, L.; Bissiere, S.; Levi, V.; Plachta, N. Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo. *Cell* **2016**, *165*, 75–87. [[CrossRef](#)]
136. Jones, D.L.; Leroy, P.; Unoson, C.; Fange, D.; Ćurić, V.; Lawson, M.J.; Elf, J. Kinetics of dCas9 target search in *Escherichia coli*. *Science* **2017**, *357*, 1420–1424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Normanno, D.; Boudarène, L.; Dugast-Darzacq, C.; Chen, J.; Richter, C.; Proux, F.; Bénichou, O.; Voituriez, R.; Darzacq, X.; Dahan, M. Probing the target search of DNA-binding proteins in mammalian cells using TetR as model searcher. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7357. [[CrossRef](#)]
138. Hansen, A.S.; Amitai, A.; Cattoglio, C.; Tjian, R.; Darzacq, X. Guided nuclear exploration increases CTCF target search efficiency. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16*, 257–266. [[CrossRef](#)]







139. Doucleff, M.; Clore, G.M. Global jumping and domain-specific intersegment transfer between DNA cognate sites of the multidomain transcription factor Oct-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13871–13876. [[CrossRef](#)]
140. Hedglin, M.; Zhang, Y.; O'Brien, P.J. Isolating Contributions from Intersegmental Transfer to DNA Searching by Alkyladenine DNA Glycosylase. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 24550–24559. [[CrossRef](#)]
141. Sheinman, M.; Kafri, Y. The effects of intersegmental transfers on target location by proteins. *Phys. Biol.* **2009**, *6*, 016003. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Zinc finger protein ZNF384 is an adaptor of Ku to DNA during classical non-homologous end-joining

Jenny Kaur Singh¹, Rebecca Smith ², Magdalena B. Rother¹, Anton J. L. de Groot¹, Wouter W. Wiegant¹, Kees Vreeken¹, Ostiane D'Augustin ^{2,3}, Robbert Q. Kim ⁴, Haibin Qian⁵, Przemek M. Krawczyk⁵, Román González-Prieto ⁵, Alfred C. O. Vertegaal⁵, Meindert Lamers⁵, Sébastien Huet ^{2,6} & Haico van Attikum ¹✉

DNA double-strand breaks (DSBs) are among the most deleterious types of DNA damage as they can lead to mutations and chromosomal rearrangements, which underlie cancer development. Classical non-homologous end-joining (cNHEJ) is the dominant pathway for DSB repair in human cells, involving the DNA-binding proteins XRCC6 (Ku70) and XRCC5 (Ku80). Other DNA-binding proteins such as Zinc Finger (ZnF) domain-containing proteins have also been implicated in DNA repair, but their role in cNHEJ remained elusive. Here we show that ZNF384, a member of the C2H2 family of ZnF proteins, binds DNA ends *in vitro* and is recruited to DSBs *in vivo*. ZNF384 recruitment requires the poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)-dependent expansion of damaged chromatin, followed by binding of its C2H2 motifs to the exposed DNA. Moreover, ZNF384 interacts with Ku70/Ku80 via its N-terminus, thereby promoting Ku70/Ku80 assembly and the accrual of downstream cNHEJ factors, including APLF and XRCC4/LIG4, for efficient repair at DSBs. Altogether, our data suggest that ZNF384 acts as a 'Ku-adaptor' that binds damaged DNA and Ku70/Ku80 to facilitate the build-up of a cNHEJ repairosome, highlighting a role for ZNF384 in DSB repair and genome maintenance.

¹Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands. ²Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de génétique et développement de Rennes)—UMR 6290, BIOSIT-UMS3480, F-35000 Rennes, France. ³Institut de Biologie François Jacob, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Université Paris-Saclay, Université de Paris, CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. ⁴Department of Cell and Chemical Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands. ⁵Department of Medical Biology, Amsterdam University Medical Centers (location AMC), Cancer Center Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands. ⁶Institut Universitaire de France, F-75000 Paris, France. ✉email: h.van.attikum@lumc.nl

DNA double-strand breaks (DSBs) represent one of the most toxic lesions that can occur in the human genome. If left unrepaired or repaired incorrectly, they can lead to loss of genetic information, thereby contributing to the development of diseases, including cancer¹. In order to maintain genomic stability, cells have evolved pathways for the signaling and repair of these DSBs¹. DSB repair can occur by either homologous recombination (HR) or non-homologous end-joining (NHEJ). HR is the more faithful repair pathway, which is active in the S and G2 phases of the cell cycle. It requires end resection to form large stretches of single-stranded DNA (ssDNA), which in turn become coated by the ssDNA-binding complex RPA and the recombinase RAD51. Collectively, these and several other auxiliary factors contribute to HR by using the sister chromatid as a template for repair². In contrast, the dominant repair pathway in human cells is canonical non-homologous end-joining (cNHEJ), which requires minimal DNA-end processing and is initiated by the binding of Ku70/Ku80 heterodimers to the broken ends, followed by activation of DNA-PKcs kinase and recruitment of APLF via its conserved Ku-binding motif (KBM). This facilitates the assembly of the XLF-XRCC4-LIG4 complex, which stimulated by PAXX, ligates the broken ends predominantly in an error-free manner³. When cNHEJ is disabled, DSB repair can also occur via alternative non-homologous end-joining (aNHEJ), which seals the broken ends in an error-prone fashion by microhomology usage and in a manner dependent on the XRCC1-Ligase III complex or POLQ³. Alternatively, in the case of more extensive end-resection, microhomology usage may lead to deleterious, RAD52-dependent repair of DSBs via single-strand annealing (SSA)⁴.

Efficient detection and repair of DSBs is complicated by the packaging of DNA into chromatin. ATP-dependent chromatin remodeling enzymes and a wide plethora of enzymes that induce post-translational modifications (PTMs) on damaged chromatin, including but not limited to acetylation, methylation, and ubiquitylation, are therefore required to change chromatin structure at DSB sites to facilitate repair^{5–7}. One of these enzymes is poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), which becomes activated upon binding to DNA breaks and promotes chromatin expansion by the formation of poly(ADP-ribose) (PAR) chains on itself and adjacent nuclear proteins, such as histones, as well by facilitating the recruitment of ATP-dependent chromatin remodelers in the vicinity of these breaks^{8–10}. This increases chromatin accessibility and the recruitment of several DSB repair proteins, including Ku70/Ku80 and XRCC4, via direct PAR binding or DNA binding^{9,11}.

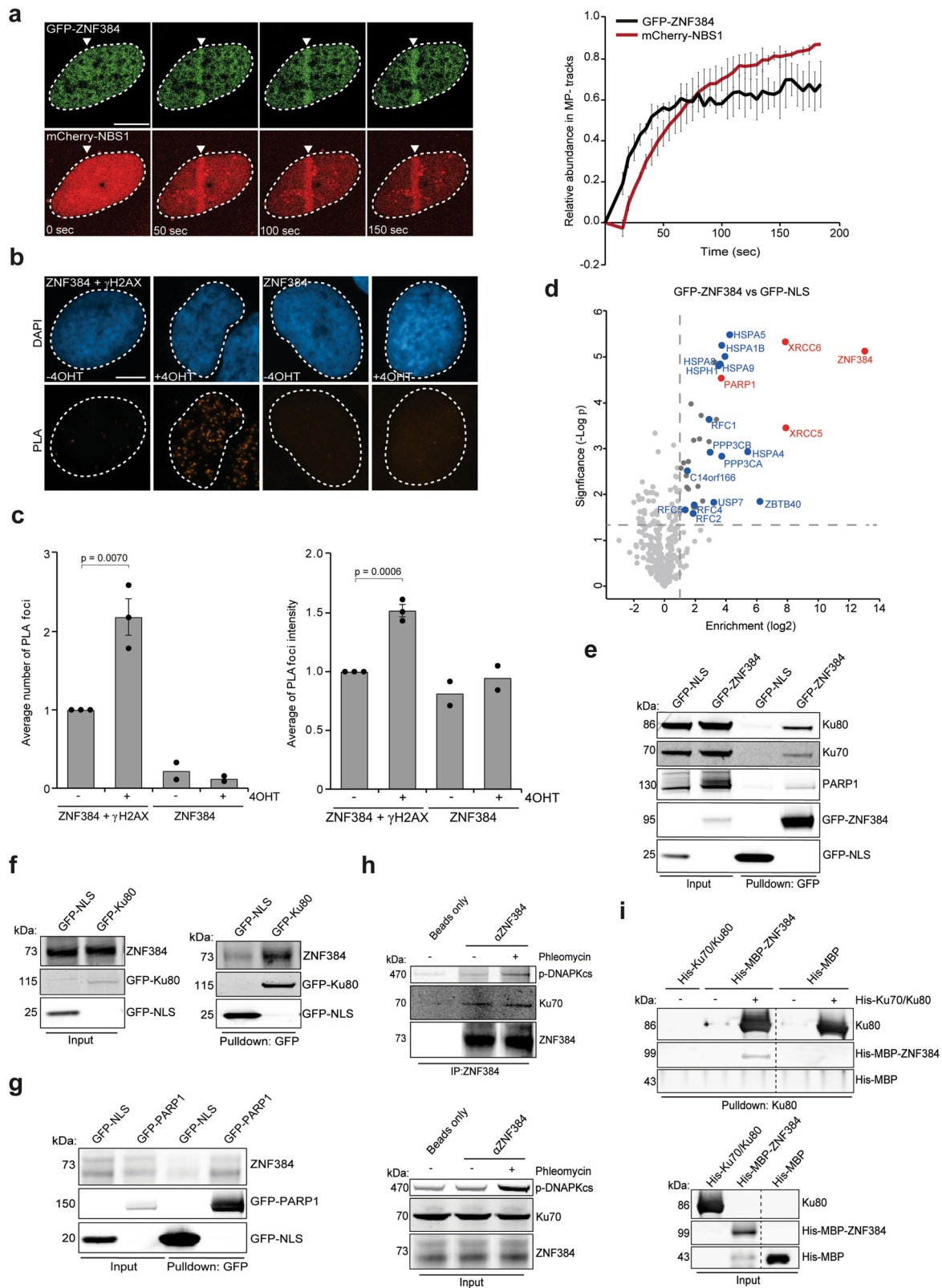
Interestingly, a number of transcription factors have also been shown to localize at sites of DNA damage either in a PARP/PAR-dependent manner or via their DNA-binding domains^{11,12}. Their role in DSB repair, is, however, largely unknown. One such class of transcription factors are Zinc Finger (ZnF) domain-containing proteins. ZnF domains exist in ~5% of all human proteins and bind to a large variety of substrates, including DNA, RNA, lipids, and post-translational modifications (PTMs)^{13,14}. Due to their versatile binding ability, ZnF proteins play roles in different cellular processes, such as transcription regulation, signal transduction, and cell migration¹⁵. Interestingly, recent studies have implicated ZnF domain-containing proteins as new players in DSB repair¹³. For instance, ZMYND8 was found to play a role in transcription repression during DSB repair via HR¹⁶, whereas ZNF830 promotes HR by facilitating RBBP8 (CTIP)-dependent DNA-end resection¹⁷. ZNF281, on the other hand, was shown to promote XRCC4-dependent NHEJ of DSBs¹⁸. Together, these findings suggest a more important role for ZnF domain proteins in DSB repair than previously anticipated, although their mode of action is still poorly understood.

Here, we describe an important regulatory role for the C2H2-type ZnF protein ZNF384 in DSB repair by cNHEJ. ZNF384 is recruited to sites of DNA damage in a manner dependent on PARP1/PAR-mediated chromatin expansion followed by binding to the exposed DNA via its internal C2H2 domain. Moreover, ZNF384 physically interacts with Ku70/Ku80 via its N-terminus and both its interaction with DNA and Ku70/Ku80 are critical for efficient Ku70/Ku80 loading. This in turn allows for the assembly of a complete repairosome that includes cNHEJ proteins such as APLF and XRCC4/LIG4, thereby facilitating cNHEJ. Collectively, our data show that zinc-finger protein ZNF384 is an adapter of Ku to DNA during DSB repair via cNHEJ.

Results

ZNF384 is recruited to DNA damage sites and interacts with NHEJ proteins. ZNF384 was among the candidate ZnF proteins that localize at sites of DNA damage induced by laser micro-irradiation¹². To validate this finding, we transiently co-expressed GFP-tagged ZNF384 (isoform 2, containing 6 C2H2 motifs) and the DNA damage sensor mCherry-NBS1 in ZNF384 knockout (KO) U2OS cells (Supplementary Fig. 1A) and measured their recruitment to sites of DNA damage induced by multiphoton irradiation using live-cell imaging (Supplementary Fig. 1B). GFP-ZNF384 was recruited to NBS1-marked DNA damage sites within 1 min and remained enriched at these sites for at least 3 minutes (Fig. 1a). We also observed the accumulation of endogenous ZNF384 at UV-A laser-induced DNA damage, which was completely abolished following ZNF384 knockdown, confirming the specificity of the ZNF384 antibody (Supplementary Fig. 1C). Since multiphoton and UV-A laser micro-irradiation may induce a variety of lesions other than DSBs, we next examined whether ZNF384 is specifically recruited to DSBs. First, we monitored its accumulation at chromatin regions micro-irradiated by ultrasoft X-rays (USX)¹⁹. Endogenous ZNF384 accumulated at USX-induced DSBs, co-localizing with γ H2AX (Supplementary Fig. 1D, E), and with the core cNHEJ proteins Ku70 and XRCC4 (Supplementary Fig. 1F, G). Second, we measured the colocalization between ZNF384 and γ H2AX at *Asi*SI nuclease-induced DSBs the proximity ligation assay (PLA) (Fig. 1b). We observed a clear colocalization between ZNF384 and γ H2AX at these DSBs (Fig. 1c), as well as between TP53BP1 (53BP1) and γ H2AX (Supplementary Fig. 1H, I and ref. ²⁰), showing the validity of the approach. Together, these observations demonstrate that ZNF384 is recruited to DSBs.

To gain insight into ZNF384's function at sites of DNA damage, we aimed to identify possible interaction partners of ZNF384. To this end, we generated U2OS Flp-In/T-Rex cells stably expressing inducible GFP-tagged ZNF384 or GFP-NLS, and performed GFP-trap-based pull-downs followed by label-free mass spectrometry (MS) (Fig. 1d). Our analysis revealed that ZNF384 interacts with 24 proteins that were at least twofold enriched in GFP-ZNF384 pull-downs when compared to those of GFP-NLS (Fig. 1d and Supplementary Table 1). Interestingly, Ku70/Ku80 and PARP1 belonged to the top interactors, all of which regulate DSB repair via cNHEJ^{9,21}. GFP pull-downs coupled to western blot analysis confirmed that GFP-tagged ZNF384 interacts with endogenous Ku70, Ku80, and PARP1 (Fig. 1e), while reciprocal pull-downs of both GFP-Ku80 (Fig. 1f) and GFP-PARP1 (Fig. 1g) revealed interactions with endogenous ZNF384. Moreover, we also confirmed the ZNF384-Ku70 interaction endogenously (Fig. 1h), using ZNF384 knockdown cells to show the specificity of the ZNF384 signal in the Ku70 immunoprecipitation (Supplementary Fig. 1j). To rule out an indirect interaction between these proteins, we purified His-MBP-



tagged ZNF384 and addressed its ability to bind Ku70/Ku80 in vitro. In agreement with our in vivo pull-down results, we found that recombinant ZNF384 bound recombinant Ku70/Ku80, demonstrating a direct protein–protein interaction (Fig. 1i). These findings suggest that ZNF384 forms a complex with Ku70/Ku80 and PARP1, manifesting a possible role for ZNF384 in NHEJ.

ZNF384 recruitment to DNA damage sites requires the activity of PARP1. Because of ZNF384’s interaction with Ku70/Ku80 and PARP1, we first analyzed whether it is recruited to DNA breaks via Ku80. We observed that GFP-ZNF384 recruitment to UV-A laser micro-irradiation induced DNA damage, as well as that of the DNA damage marker NBS1 (Supplementary Fig. 2A, B), remained unchanged in cells depleted of Ku80 or its interaction

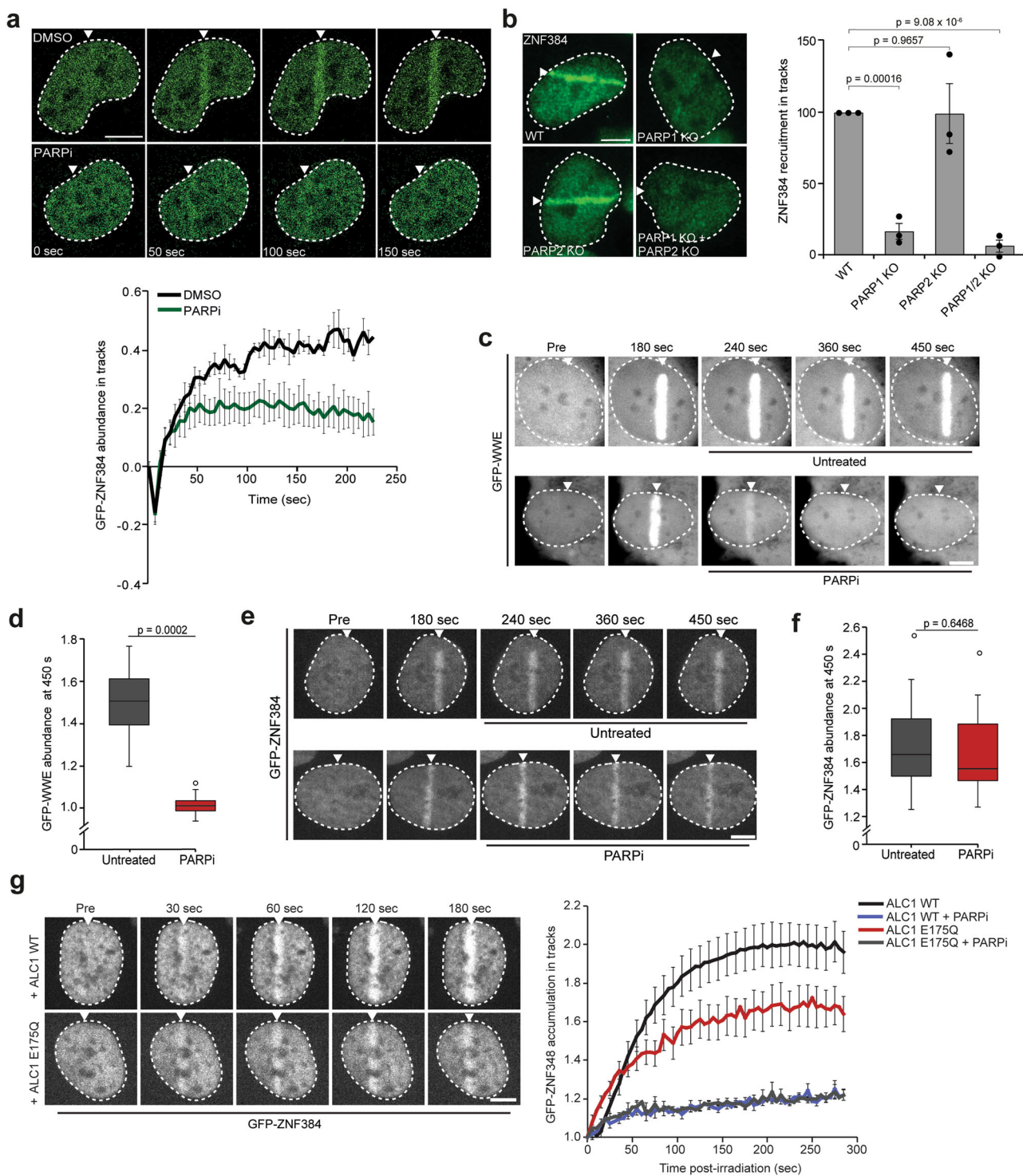
Fig. 1 ZNF384 is recruited to DNA damage sites and interacts with NHEJ proteins. **a** Recruitment of GFP-ZNF384 to 800 nm multiphoton tracks in U2OS Flp-In/T-Rex ZNF384 KO cells. mCherry-NBS1 was used as a DNA damage marker (left panel). White triangles indicate irradiated regions. Quantification of the data is plotted on a timescale as relative abundance in tracks. Peak values were set to 1. The graph represents the mean \pm SD of >30 cells acquired in 2–3 independent experiments (right panel). **b** PLA of ZNF384 and γ H2AX in AsiSI-ER-U2OS cells treated with 4-OHT for DSB induction. PLA foci were quantified after 5 h of DSB induction. **c** Quantification of **(b)**. The mean \pm SEM of PLA foci formation and foci intensity from >200 cells acquired in 2–3 independent experiments are shown. Statistical significance was calculated using the two-tailed Student's *t* test. **d** Volcano plot depicting the statistical differences of the MS analysis on GFP-ZNF384 versus GFP-NLS pull-downs. The enrichment is plotted on the x axis and the significance (*t* test $-\log_2 P$ value) is plotted on the y axis. NHEJ factors are shown in red and several hits are shown in blue (see also Supplementary Table 1). **e** Pull-down of the indicated GFP fusion proteins in U2OS Flp-In/T-Rex cells. Blots were probed for GFP, Ku70, Ku80, and PARP1. **f** Pull-downs of the indicated GFP fusion proteins in HeLa cells. Blots were probed for GFP and ZNF384. **g** Pull-downs of the indicated GFP fusion proteins in HeLa cells. Blots were probed for GFP and ZNF384. **h** Immunoprecipitation (IP) of endogenous ZNF384 from 500 μ M Phleomycin-treated U2OS cells. Control IP contained beads only. Blots were probed for ZNF384, p-DNA-PKcs (S2056), and Ku70. **i** In vitro Ku80 pull-down in the presence or absence of His-Ku70/Ku80 and His-MBP or His-MBP-ZNF384. Control IP contained beads only. Blots were probed for Ku80 and MBP. Scale bar 5 μ m. Source data are provided as a Source Data file.

partner in the DNA-PK complex, DNA-PKcs kinase (Supplementary Fig. 2A, B)²². Moreover, we also found endogenous ZNF384 at γ H2AX-marked UV-A laser-inflicted DNA damage to remain unaffected in cells depleted of Ku70 (Supplementary Fig. 2C, D), Ku80, or DNA-PKcs (Supplementary Fig. 2E), which was confirmed in *Xrs-5* KO hamster cells defective for Ku80 (Supplementary Fig. 2F, G) and ref. 23, ruling out effects of incomplete knockdown. In addition, inhibition of DNA-PKcs kinase activity did not exert any effect on the recruitment of GFP-ZNF384 (Supplementary Fig. 2H) and endogenous ZNF384 (Supplementary Fig. 2I, J), suggesting that ZNF384 recruitment is independent of DNA-PK.

Next, we treated cells with the PARP1 and PARP2 inhibitor (PARPi) olaparib (Fig. 2a) and found this treatment to impair the recruitment of GFP-ZNF384 at multiphoton laser micro-irradiation (Fig. 2a), as well as UV-A laser micro-irradiation induced DNA damage (Supplementary Fig. 3A, B). Similarly, knockout of PARP1 alone or in combination with PARP2 completely impaired ZNF384 recruitment, whereas knockout of PARP2 alone, and knockdown of PARP3 had no major effect (Fig. 2b and Supplementary Fig. 3C–F). PARP3 knockdown, however, impaired Ku80 recruitment as expected (Supplementary Fig. 3G, H and ref. 24). Importantly, we previously showed that PARP1 itself is still recruited to sites of DNA damage in PARPi-treated cells²⁵, suggesting that the recruitment of ZNF384 does not involve a physical interaction between ZNF384 and PARP1, but rather relies on PARP1's activity. Possibly, this interaction is important for the PARP1-dependent PARylation of ZNF384, which we and others observed in response to DSB induction (Supplementary Fig. 3I and ref. 26). Collectively, these results suggest that ZNF384 is rapidly recruited to DSB-containing tracks in a manner dependent on the activity of PARP1.

PARP1-dependent chromatin unfolding facilitates DNA binding of ZNF384 at DNA damage sites. We next asked whether the PARP1 activity-dependent recruitment of ZNF384 to DNA breaks could be due to the direct binding of ZNF384 to PARP1-generated PAR moieties. To investigate this, we used a previously established fluorescence three-hybrid assay (Supplementary Fig. 4A)²⁷. This assay measures the ability of a lacO-anchored putative “ADP-ribose-binding” protein of interest to interact with PARylated PARP1 that is naturally released from sites of laser-induced DNA damage and is then free to diffuse and bind to the lacO-anchored PAR-binder. Indeed, we observed recruitment of PARylated PARP1 to the lacO-anchored macrodomain of macroH2A1.1, a well-characterized PAR-binding protein^{11,28}, which was abolished following treatment with PARPi, but remained unaffected by treatment with PARGi (likely due to the availability of a limited number of lacO-anchored macrodomain molecules) (Supplementary Fig. 4B–D).

In contrast, we did not observe an interaction between lacO-anchored ZNF384 and PARylated PARP1 (Supplementary Fig. 4E, F). To corroborate and extend these findings, we used a second independent approach that can discriminate whether ZNF384 is recruited by binding to PAR, or to DNA that becomes exposed upon PAR-dependent chromatin relaxation. In this assay ZNF384 KO cells were micro-irradiated and, 240 seconds post irradiation, after the completion of the initial wave of PARP/PAR-dependent chromatin relaxation^{9,27,29}, PARPi was added to acutely block PARP enzymatic activity. Under these conditions, PAR-binding proteins are rapidly released from the damaged area, while proteins that bind DNA are maintained¹¹. Indeed, we observed that the WWE domain of RNF146, which is a known PAR-binder³⁰, was rapidly released from the irradiated area (Fig. 2c, d and Supplementary Fig. 5A). While its binding was nearly completely reversed at 450 seconds post irradiation due to rapid degradation of PAR (Supplementary Fig. 5A), counteracting the removal of PAR chains by adding PARGi to the PARPi-treated cells preserved the accumulation of the WWE domain (Supplementary Fig. 5A, B). In contrast, PARPi treatment did not revert the recruitment of GFP-ZNF384 at the damaged area (Fig. 2e, f), suggesting that ZNF384 does not bind PAR, but rather associates with DNA. To corroborate these findings, we investigated whether DNA binding of ZNF384 depends on PARP/PAR-dependent chromatin relaxation, which we and others have shown to facilitate the association of DNA-binding proteins with DNA at sites of damage^{9,27,29}. We found that overexpression of the ATP-dependent chromatin remodeler ALC1, which enhances chromatin unfolding without affecting PAR-signaling (Supplementary Fig. 5C and ref. 27), increased ZNF384 accumulation at DNA damage sites when compared to that after overexpression of ATPase-dead (E175Q) ALC1 (Fig. 2g). PARPi treatment inhibited ZNF384 recruitment in both WT ALC1 and ATPase-dead (E175Q) ALC1 overexpressing cells (Fig. 2g), consistent with the PARP-dependent recruitment of these proteins⁸. Interestingly, we did not find a significant enrichment of ZNF384 in chromatin-enriched extracts from cells treated with phleomycin (Supplementary Fig. 5D, E), or a change in ZNF384 turnover at DNA lesions as measured by FRAP (Supplementary Fig. 5F–H), suggesting that the binding of ZNF384 to damaged DNA is not qualitatively different from its binding to undamaged DNA and is mostly triggered by the increased accessibility of DNA consecutive to PAR-driven chromatin relaxation. This behavior of ZNF384 is comparable to that of the DNA-binding domain BZIP of C/EBPa (Supplementary Fig. 5I and ref. 11) and the chromatin remodeler CHD4 (Supplementary Fig. 5I and ref. 27), which were both shown to recruit to DNA lesions due to increased accessibility of damaged DNA through PAR-dependent chromatin unfolding. In contrast, the ZNF384 interaction partners and DNA-end binding proteins Ku70/Ku80 showed a clear slowing of



its turnover following DNA damage (Supplementary Fig. 5). Thus, ZNF384 recruitment is dependent on PAR-dependent chromatin unfolding, allowing ZNF384 to bind to the exposed damaged DNA.

Previous work indeed showed that ZNF384 belongs to one of the few C2H2-type of ZnF proteins reported having unique DNA-binding affinity, particularly for homopolymeric dA-dT DNA consensus elements enriched in the genome³¹. We performed biolayer interferometry (BLI) experiments and in vitro DNA pull-down experiments using purified His-MBP-tagged ZNF384 and confirmed that His-MBP-ZNF384, in contrast to His-MBP alone, has a high affinity to bind T-rich

ssDNA (Supplementary Fig. 6A, B), as opposed to A-rich ssDNA (Fig. 3a). Extending this finding, we also found ZNF384 to bind double-stranded (ds)DNA with either a 3'- or 5' overhang in both BLI and in vitro DNA pull-down assays, albeit with a seemingly lower affinity when compared to ssDNA (Fig. 3a, b). Importantly, ZNF384 bound poorly, if at all, to dsDNA, and did not show RNA binding (Supplementary Fig. 6C). Moreover, it showed reduced colocalization with 5-ethynyl uridine (5-EU) labeled RNA compared to Hoechst labeled DNA as quantified by the Pearson correlation coefficient (Supplementary Fig. 6D). Collectively, these results suggest that ZNF384 recruitment to DNA damage sites is dependent on

Fig. 2 PARP1 activity facilitates DNA binding of ZNF384 at sites of damage. **a** GFP-ZNF384 recruitment to 800 nm multiphoton tracks in stable U2OS Flp-In/T-Rex cells treated with PARP inhibitor (PARPi) for 1 h before micro-irradiation (top panel). Quantification of the data is presented as the mean \pm SEM of >35 cells acquired in three independent experiments (bottom panel). **b** ZNF384 recruitment to 365 nm UV-A tracks 10 min after DNA damage induction in BrdU-sensitized wild-type (WT) and the indicated KO U2OS cells (left panel). The mean \pm SEM of >180 cells from three independent experiments is shown (right panel). **c** Confocal images showing accumulation of GFP-WWE at sites of 405 nm laser micro-irradiation in Hoechst-sensitized U2OS cells. Cells were left untreated or treated with PARPi 180 s after DNA damage induction. **d** Boxplot limits correspond to the 25th and 75th percentiles and the center line in the box indicates the median value of the accumulation of GFP-WWE at 450 s post irradiation from 23–25 cells from a representative of three independent experiments. **e** As in (c), except for GFP-ZNF384. **f** As in (d), except for GFP-ZNF384 from 21–27 cells. Boxplot limits correspond to the 25th and 75th percentiles and the center line in the box indicates the median value. The whiskers extend 1.5 times the interquartile range. **g** GFP-ZNF384 recruitment to 405 nm laser tracks in U2OS cells overexpressing iRFP-ALC1 wild-type (WT) and iRFP-ALC1 ATPase-dead (E175Q) treated with PARPi for 1 h before micro-irradiation (left panel). GFP-ZNF384 recruitment is displayed as intensity integrated over the damaged area (right panel). The mean \pm SEM from 13–16 cells from a representative of three independent experiments is shown. White triangles indicate irradiated regions. Scale bar 5 μ m. All *P* values were calculated using the unpaired Student's *t* test, assuming unequal variances. Source data are provided as a Source Data file.

PARP-induced chromatin relaxation and its affinity to bind damaged DNA.

ZNF384 is recruited to sites of DNA damage via its C2H2 DNA-binding motif. The fact that ZNF384 is recruited to DNA damage sites and binds DNA, encouraged us to investigate whether the C2H2, N-terminal or C-terminal domain of ZNF384 is implicated in this process (Fig. 3c). To this end, we purified His-MBP-tagged versions of these ZNF384 domains (Supplementary Fig. 6A), and assessed their ability to bind dsDNA with a 3' overhang, a common substrate found at DNA breaks, in vitro by BLI and DNA pull-down assay. As expected, full-length ZNF384 was able to bind this DNA substrate, whereas its N-terminus and C-terminus revealed very poor to no binding (Supplementary Fig. 7A, B). In contrast, the C2H2 domain showed stronger binding to this substrate, which was even comparable to that of full-length ZNF384 in the BLI assay (Supplementary Fig. 7A, B). Finally, we also observed that the C2H2 domain, similar to full-length ZNF384, has affinity for ssDNA, as well as for dsDNA with a 3' or 5' overhang, albeit that the affinity for the latter two substrates was seemingly lower when compared to that for ssDNA (Supplementary Fig. 7C, D). Together, these findings show that ZNF384 binds different DNA substrates through its C2H2 domain.

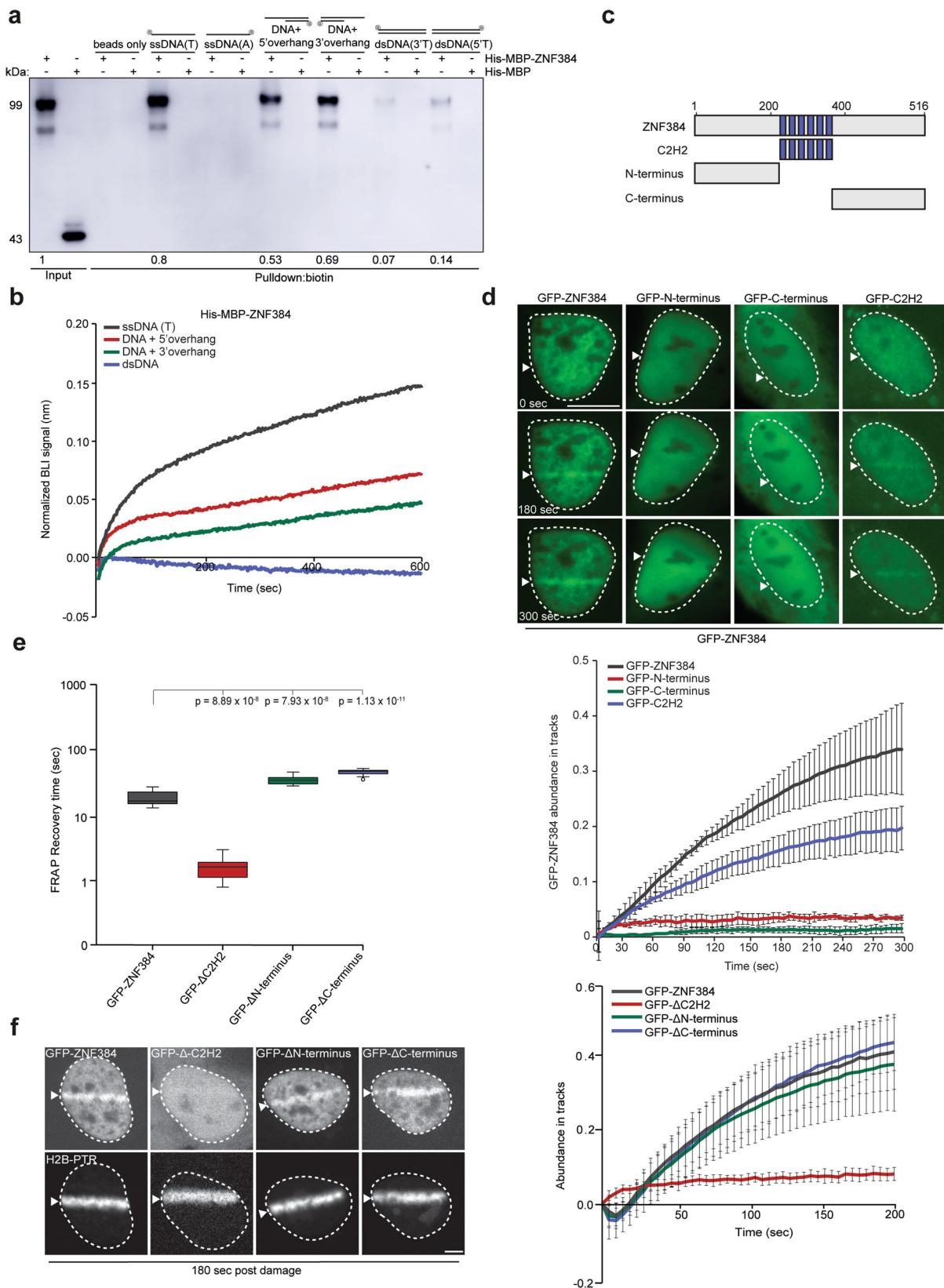
Given the different DNA-binding affinities of these ZNF384 domains, we next assessed their relevance for ZNF384 recruitment to DNA damage sites. To this end, we studied the recruitment of GFP-tagged versions of the C2H2, N-terminal or C-terminal domains to UV-A laser micro-irradiation inflicted DNA damage (Fig. 3d) in ZNF384 KO U2OS cells. This was to avoid the possible dimerization of any of the GFP-tagged domains with endogenous ZNF384 as observed for GFP-ZNF384 and endogenous ZNF384 (Supplementary Fig. 7E). mCherry-NBS1 was co-expressed in these cells to control for DNA damage induction (Supplementary Fig. 7F). In agreement with our in vitro experiments, we found that the C2H2 domain was still recruited, while recruitment of the N-terminus and C-terminus was completely abolished (Fig. 3d). Consistently, we also found the colocalization between ZNF384 and DNA to be dependent on its C2H2 motif (Supplementary Fig. 6D).

Next, we sought to test the DNA-binding affinity of ZNF384-deletion mutants in vivo. We generated a Δ C2H2 mutant lacking the six C2H2 motifs, (Δ C2H2), as well as mutants lacking the N-terminus (Δ N-terminus) or C-terminus (Δ C-terminus) (Supplementary Fig. 7G), and estimated the ability of full-length ZNF384 and Δ C2H2 to bind DNA using FRAP. In this assay, strong DNA-binding affinity corresponds to a slow FRAP recovery and vice versa. While full-length ZNF384 showed a slow recovery after photobleaching of the damaged area, we observed a fast recovery of Δ C2H2. In contrast, Δ N-terminus and

Δ C-terminus showed a slower FRAP recovery compared to full-length ZNF384, suggesting that the deleted domains slightly destabilize ZNF384's interaction with DNA (Fig. 3e and Supplementary Fig. 7H). We then assessed the recruitment of these GFP-tagged deletion mutants to DNA damage 405 laser micro-irradiation in Hoechst-sensitized ZNF384 KO U2OS cells. Core histone H2B fused to photoactivatable PATagRFP (PTR) was co-expressed to define the damaged area. We found that Δ C2H2 dramatically impaired ZNF384 recruitment, while Δ N-terminus and Δ C-terminus had no major effect on recruitment (Fig. 3f). Collectively, these findings suggest that the C2H2 motif is important for DNA binding and accumulation of ZNF384 at DNA damage sites.

ZNF384 modulates Ku70/Ku80 dynamics at DNA damage sites. The repair of DSBs by cNHEJ depends on the binding of the Ku70/Ku80 heterodimer to broken DNA ends, followed by the recruitment of the DNA-PKcs kinase (Mari, Florea et al.³²). This in turn leads to the recruitment of the XRCC4-LIG4 complex, which ultimately seals the broken ends (Frit, Ropars et al.³³). Given the interaction between ZNF384 and Ku70/Ku80, we sought to address if ZNF384 is involved in the loading of Ku70/Ku80 at DNA. To this end, we first monitored the levels of Ku70 in chromatin-enriched extracts from cells depleted of ZNF384 or Ku80 (Supplementary Fig. 8A). While *Ku80* knockdown reduced Ku70 levels on chromatin, depletion of ZNF384 had no impact (Supplementary Fig. 8A). Next, we monitored the impact of ZNF384 on Ku70 dynamics at DNA by FRAP. Within 2 seconds after photobleaching, we observed a small increase in fluorescence recovery of GFP-Ku70 in ZNF384-depleted cells compared to that in control cells (Supplementary Fig. 8B), suggesting that ZNF384 has a modest effect on Ku70's DNA binding. To further investigate this finding, we assessed the DNA-binding affinities of both ZNF384 and Ku70 by comparing their relative residence times as measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) (Supplementary Fig. 8C). Interestingly, we observed that ZNF384 has a higher residence time compared to Ku70 (Supplementary Fig. 8D), suggesting that ZNF384 is more tightly bound to DNA, thereby impacting the association of Ku70/Ku80 with DNA.

Based on these findings, we next examined whether ZNF384 has a potential stimulatory role on Ku70/Ku80's binding to dsDNA with a 3' overhang in vitro. To this end, we performed DNA pull-down assays using purified ZNF384 and Ku70/Ku80. Importantly, while Ku70/Ku80 bound dsDNA with a 3' overhang in the absence of ZNF384³⁴ their binding was enhanced in the presence of increasing amounts of ZNF384 (Fig. 4a and Supplementary Fig. 8E). To examine whether ZNF384 also affects the loading of Ku70/Ku80 at damaged DNA in vivo, we depleted ZNF384 in cells expressing endogenously GFP-tagged Ku70 (Britton, Coates et al.³⁵), and subjected these cells to multiphoton



laser micro-irradiation. Importantly, ZNF384 depletion reduced GFP-Ku70 accumulation at sites of DNA damage as compared to that in control cells (Fig. 4b, c). Given that ZNF384 is recruited to DNA breaks in a PAR-dependent manner (Fig. 2a) and regulates the loading of Ku70/Ku80, we asked whether Ku70/Ku80 is also recruited to sites of DNA damage in a PAR-dependent manner.

Indeed, we found PARPi treatment to impair the recruitment of Ku70 to DNA breaks (Supplementary Fig. 8F), while the accumulation of the DNA damage marker NBS1 remained unaffected (Supplementary Fig. 8G, H). To better understand the impact of ZNF384 on the dynamics of Ku70, we assessed its turnover at DNA lesions by FRAP. Within 10 seconds after

Fig. 3 ZNF384 is recruited to sites of DNA damage via its C2H2 DNA-binding motif. **a** DNA pull-downs of the indicated biotinylated DNA substrates in the presence of His-MBP-C2H2 or His-MBP (control). Blots were probed for MBP. His-MBP-ZNF384 pull-down signals were normalized to the Input signal, which was set to 1. The mean from four independent experiments is indicated below the blot. His-MBP was not detectable in pull-downs. A representative experiment is shown. **b** DNA binding of His-MBP-ZNF384 to the indicated biotinylated DNA substrates as measured by BLI. Quantified data are plotted on a timescale and normalized to His-MBP (control). **c** Schematic representation of full-length ZNF384 protein and its domains (C2H2, N-terminus, and C-terminus). **d** Live-cell imaging of the recruitment of the indicated GFP-ZNF384 proteins to DNA damage tracks generated by 365 nm UV-A laser micro-irradiation in BrdU-sensitized ZNF384 KO U2OS Flp-In/T-Rex cells. mCherry-NBS1, which was co-expressed with the GFP-ZNF384 proteins, served as a DNA damage marker. Representative images are shown. White triangles indicate irradiated regions. Scale bars: 10 μ m (upper panel). Quantification of the data is shown as mean \pm SEM from 30–40 cells (lower panel). **e** Quantification of FRAP measurements to assess the local dynamics of the indicated GFP-ZNF384 constructs. 12 cells per condition were analyzed. Boxplot limits correspond to the 25th and 75th percentiles and the center line in the box indicates the median value. The whiskers extend 1.5 times the interquartile range. *P* values were calculated using an unpaired Student's *t* test, assuming unequal variances. **f** Live-cell imaging of the recruitment of the indicated GFP-ZNF384 proteins to DNA damage tracks generated by 405 nm laser micro-irradiation in Hoechst-sensitized ZNF384 KO U2OS Flp-In/T-Rex cells. White triangles and photoactivatable H2B-PTR, which were co-expressed with the indicated GFP-ZNF384 proteins, indicate irradiated regions. Representative images are shown. Scale bars 4 μ m (left panel). Data are presented as mean values \pm SEM. *P* values were calculated using an unpaired Student's *t* test, assuming unequal variances (right panel). Source data are provided as a Source Data file.

photobleaching, we observed a faster fluorescence recovery of GFP-Ku70 in ZNF384-depleted cells compared to that in control cells (Fig. 4d, e), suggesting that ZNF384 contributes to the association of Ku70 with DNA lesions. To be able to extract quantitative characteristics from the FRAP data, we first tried to fit the recovery curves with single-population models (Sprague, Pego et al.³⁶). However, none of them could accurately fit the experimental curves (Supplementary Fig. 9A), indicating that Ku displays a more complex behavior. We then examined Ku dynamics by FCS as this method is able to assess fast protein turnover more accurately. The fit of the correlation curves showed that Ku follows two-population dynamics at DNA damage sites (Supplementary Fig. 9B). We infer that the fast population refers to Ku molecules diffusing through the nucleus and displaying only very transient interactions with chromatin, while the slow population corresponds to Ku molecules that bind DNA lesions more stably. To characterize specifically the behavior of this slow population, we restricted the fitting of the FRAP curves to the timepoints after 3 seconds post photobleaching, which could be well adjusted by a reaction-limited model (Supplementary Fig. 9C). Using this model, we were able to estimate binding (k'_{on}) and unbinding (k_{off}) rates of Ku at sites of DNA damage by FRAP. The k'_{on} is a pseudo-first-order association rate corresponding to the product of the actual binding rate k_{on} and the local density of DNA damage sites dictated by the irradiation conditions, which was similar between the different conditions. To confirm the applicability of this model, we also verified that the k_{off} parameter estimated with this model was independent of the size of the bleached area (Supplementary Fig. 9D). Based on these fits, we observed a reduction in the k'_{on} in ZNF384-depleted cells, suggesting a decreased Ku70-binding rate (Fig. 4f). In contrast, no significant impact of ZNF384 depletion on the estimated k_{off} was observed (Fig. 4g). Together these results imply that ZNF384 facilitates the recruitment and subsequent binding, rather than the retention of Ku70/Ku80, at sites of DNA damage.

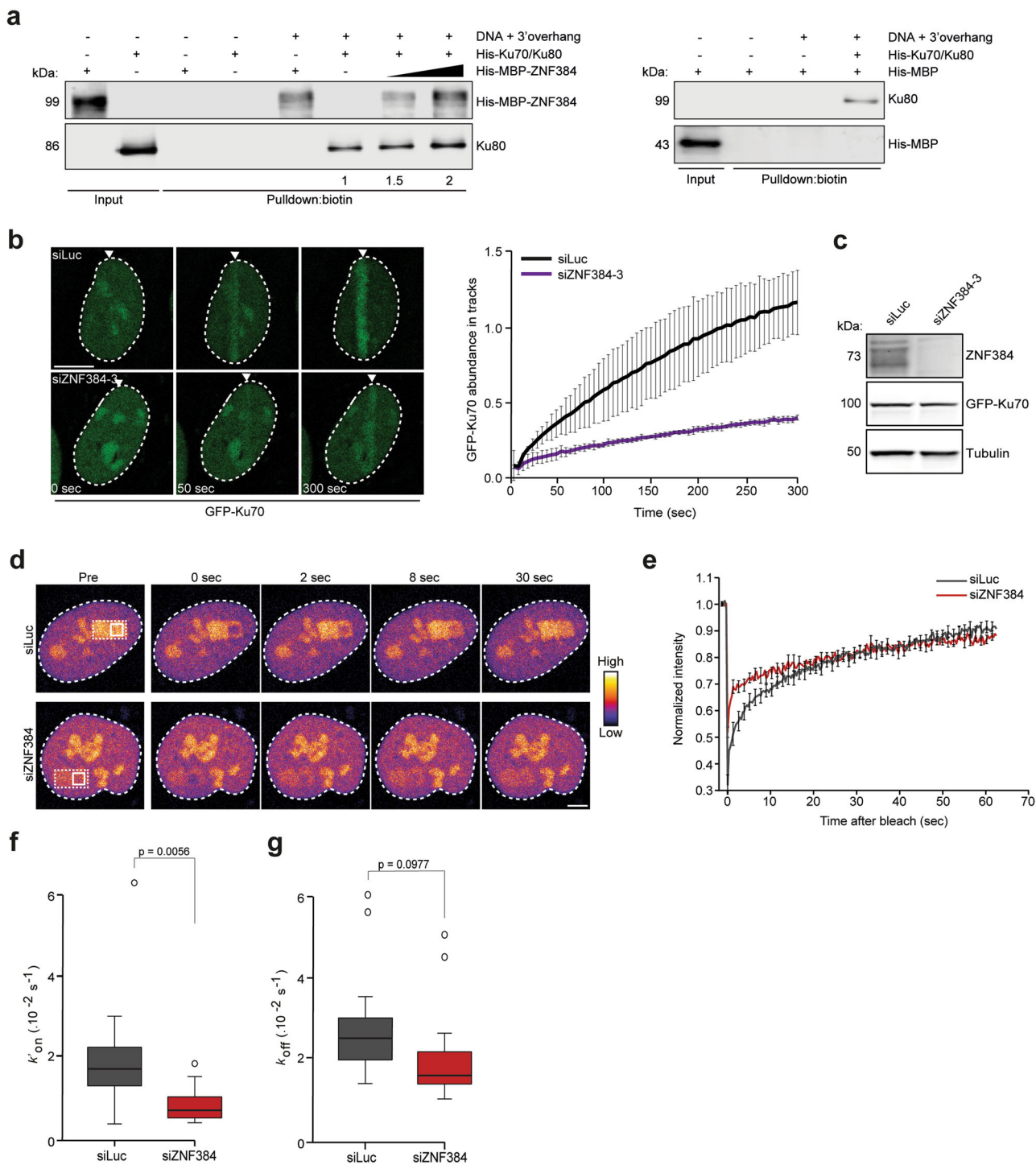
The C2H2 and N-terminal domains of ZNF384 are critical for loading Ku70/Ku80 at DSBs. Having shown that ZNF384 promotes the loading of Ku70/Ku80 at DNA breaks and considering that ZNF384 and Ku70/Ku80 physically interact, we next sought to investigate whether the interaction between these proteins is important for the efficient recruitment of Ku70/Ku80 to DNA breaks. We therefore set out to map the region in ZNF384 that is required for the interaction with Ku70/Ku80, making use of our set of ZNF384-deletion mutants (Supplementary Fig. 7G). Using GFP pull-down assays, we found that GFP-tagged ZNF384,

Δ C2H2, and Δ C-terminus associated with endogenous Ku70 and Ku80 with equal efficiency (Fig. 5a), suggesting that the C2H2 motifs and C-terminus are dispensable for the interaction. On the contrary, Δ N-terminus showed an almost complete loss of Ku70/Ku80 binding, indicating that the N-terminus of ZNF384 mediates its interaction with Ku70 and Ku80 (Fig. 5a). In agreement with our *in vivo* pull-down results, we found that recombinant Δ N-terminus bound less efficiently to Ku70/Ku80 when compared to recombinant ZNF384 (Fig. 5b).

We next asked whether the N-terminus of ZNF384 has any functional relevance for Ku70/Ku80 recruitment. To this end, we used the Flp-In/T-rx system to establish U2OS cells stably expressing inducible siRNA-resistant GFP-tagged versions of either ZNF384, Δ C2H2 or Δ N-terminus. U2OS cells stably expressing GFP-NLS served as a control (Fig. 5c). While expression of GFP-ZNF384 fully restored Ku80 accumulation at UV-A laser micro-irradiation inflicted damage, expression of Δ N-terminus only partially rescued this Ku80 defect (Fig. 5d). In contrast, the expression of Δ C2H2 completely failed to rescue the Ku80 accumulation defect (Fig. 5d). DNA damage induction was similar in all conditions based on equal PAR levels in laser tracks (Fig. 5e). These results suggest that the binding of ZNF384 at DNA breaks via its C2H2 motif, as well as the interaction between its N-terminus and Ku70/Ku80 contribute to efficient Ku80 recruitment.

Finally, we asked if ZNF384 is responsible for Ku70/Ku80 complex formation. To this end, we performed GFP pull-downs on cells expressing endogenously GFP-tagged Ku70 (Britton, Coates et al.³⁵) that were depleted of ZNF384 and left untreated or exposed to ionizing radiation (IR). While we observed that GFP-Ku70 and endogenous Ku80 interact, as expected, loss of ZNF384 did not impact this interaction, neither in untreated nor in IR-exposed cells (Supplementary Fig. 10A). This suggests that ZNF384 is not involved in Ku70/Ku80 complex formation, but rather the loading of this complex at sites of DNA damage.

ZNF384 promotes Ku-dependent loading of APLF and XRCC4/LIG4 at DSBs. Next, we asked if ZNF384 affects the accumulation of factors that act downstream of Ku70/Ku80. We first measured the recruitment of APLF, which physically interacts with Ku80 at DSBs via its conserved Ku-binding motif (KBM)³⁷. To this end, YFP-tagged APLF and mCherry-NBS1 were co-expressed in ZNF384-, Ku80-, and ZNF384/Ku80-depleted U2OS cells, and examined for their localization at sites of DNA damage. ZNF384 and Ku80 depletion impaired APLF recruitment to sites of DNA damage, while the DNA damage marker NBS1 remained unaffected (Fig. 6a, b and ref.³⁷). Ku80



depletion also reduced nuclear retention of APLF³⁸, which we validated in Ku80 knockdown cells (Supplementary Fig. 10B, C), as well as in *Ku80* KO mouse embryonic stem cells (Supplementary Fig. 10D). Interestingly, double knockdown of ZNF384 and Ku80 did not further impair APLF accumulation, suggesting that these proteins function epistatically to recruit APLF (Fig. 6a, b).

The fact that ZNF384 promotes the consecutive accumulation of Ku70/Ku80 and APLF made us wonder if ZNF384 could be involved in Ku-APLF complex formation. To assess this, we performed GFP pull-downs after transient expression of YFP-APLF in wild-type and ZNF384-depleted U2OS cells. Endogenous Ku80 was co-precipitated in both conditions (Supplementary

Fig. 10E). Moreover, ZNF384 and Ku70 showed comparable recruitment kinetics (Supplementary Fig. S10F, G), while APLF was recruited earlier (Supplementary Fig. 10H). This suggests that ZNF384 does not impact Ku-APLF complex stability, but rather promotes the loading of these factors at sites of DNA damage.

The Ku-APLF interaction is critical for recruitment of the XRCC4/LIG4 complex to DNA breaks^{3,37,39,40}. Given that ZNF384 promotes both Ku-APLF loading at sites of DNA damage, we next examined if ZNF384 also affects XRCC4 recruitment. To this end, we measured the levels of endogenous XRCC4 at bona fide DSBs induced by tethering of a Lactose repressor (LacR)-tagged FokI nuclease at a stably integrated Lactose operator (LacO) array in U2OS cells (Fig. 6c)⁴¹. While we

Fig. 4 ZNF384 modulates Ku70/Ku80 dynamics at DNA damage sites. **a** DNA pull-downs of biotinylated DNA with a 3'-overhang in the presence of His-Ku70/Ku80, His-MBP-ZNF384, or His-MBP alone or His-Ku70/Ku80 in combination with His-MBP-ZNF384 or His-MBP. Blots were probed for MBP and Ku80. Ku80 pull-down signals were normalized to that in the pull-down lacking His-MBP-ZNF384, which was set to 1. The mean from four independent experiments is indicated below the blot. His-MBP was not detectable in pull-downs. A representative experiment is shown. **b** GFP-Ku70 recruitment to 800 nm multiphoton tracks in RPE1-hTERT cells transfected with the indicated siRNAs (left panel). White triangles indicate irradiated regions. Quantification of the data is presented as the mean \pm SD from >60 cells acquired in two independent experiments. Scale bar 5 μ m. **c** Western blot analysis of ZNF384 expression in cells from **(b)**. Tubulin is a loading control. **d** Representative images of RPE1-hTERT cells transfected with the indicated siRNAs, in which FRAP measurements were performed to assess the local turnover of GFP-Ku70 at the sites of DNA damage. DNA damage was induced in the region indicated with a dashed line. Subsequent FRAP was induced in a subarea within the DNA damage region, as indicated with an unbroken line. Images are pseudocolored according to the look-up table displayed on the right. Scale bar 4 μ m. **e** Normalized FRAP curves from **(d)**. **f** Association (k'_{on}) rates of GFP-Ku70 measured by FRAP after fitting of the curves from **(e)**. **g** Dissociation (k_{off}) rates of GFP-Ku70 after fitting of the curves from **(e)**. Data from **(e-g)** was collected from 15 cells per condition. Boxplot limits correspond to the 25th and 75th percentiles and the center line in the box indicates the median value from a representative of two independent replicates. Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t* test, assuming unequal variances. Source data are provided as a Source Data file.

detected XRCC4 accumulation at FokI-induced DSBs in control cells, as expected, its levels were dramatically reduced in ZNF384-depleted cells (Fig. 6d, e). This indicates that ZNF384 acts at bona fide DSBs to facilitate the Ku-APLF-dependent accumulation of XRCC4/LIG4 complexes.

ZNF384 promotes recruitment of cNHEJ proteins independently of DNA-PKcs. Given that ZNF384 promotes the accumulation of XRCC4/LIG4 in a Ku70/Ku80-dependent manner, we wondered how this is linked to DNA-PKcs, which is recruited and activated by DSB-bound Ku to promote the loading of XRCC4/LIG4^{42,43}. Western blot analysis detected induction of phosphorylated (p)-DNA-PKcs (S2056) after IR (Supplementary Fig. 11A). Surprisingly, neither Ku80 nor ZNF384 depletion affected p-DNA-PKcs (S2056) activation in U2OS cells (Supplementary Fig. 11A). Moreover, normal levels of p-DNA-PKcs (S2056) activation were observed in *Ku80* KO mouse embryonic stem cells, ruling out that the lack of phenotype in Ku80-depleted cells was due to incomplete knockdown (Supplementary Fig. 11B and ref. 44). To corroborate these findings, we examined the interplay between ZNF384, Ku, and DNA-PKcs during the loading of XRCC4 at sites of DNA damage. We found that ZNF384, Ku80, and DNA-PKcs depletion impaired XRCC4 accumulation (Supplementary Fig. 11C-F), which is in line with previous results^{42,45}. Double knockdown of ZNF384 and Ku80 did not result in an additive effect on XRCC4 accumulation when compared to that in ZNF384- or Ku80-depleted cells (Supplementary Fig. 11C-F). This suggests that these proteins act epistatically to recruit XRCC4, which is in line with their epistatic role in recruiting APLF to DNA breaks (Fig. 6a, b). In contrast, double knockdown of ZNF384 and DNA-PKcs resulted in a larger effect on XRCC4 accumulation when compared to that of ZNF384 or DNA-PKcs depletion alone (Supplementary Fig. 11C-F), suggesting redundant functions for these proteins in XRCC4 recruitment.

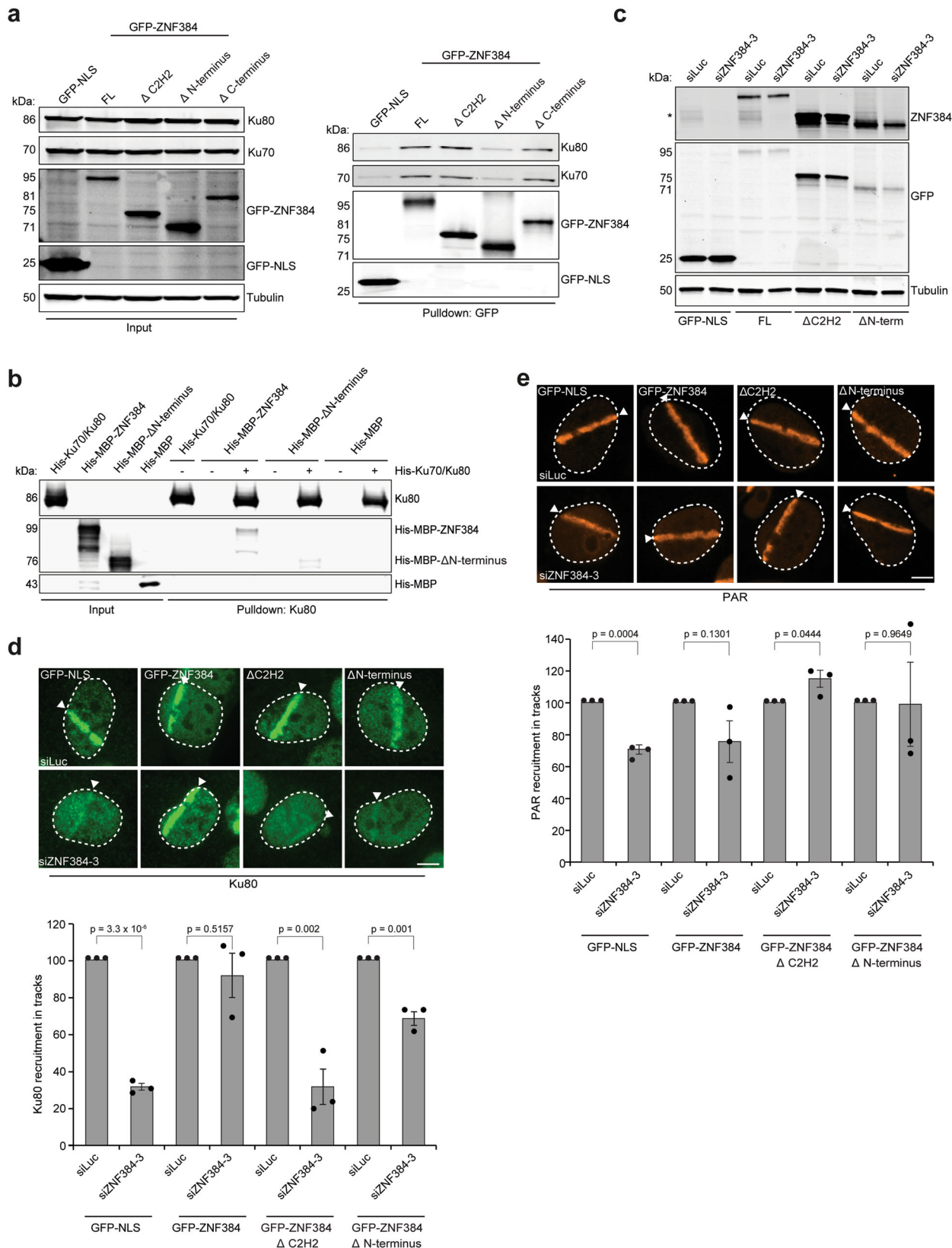
Given that ZNF384 and Ku were recruited to sites of DNA damage via PAR-driven processes (Fig. 2a and Supplementary Fig. 8F), and that ZNF384 and DNA-PKcs function redundantly, we next asked whether DNA-PKcs is also recruited to DNA breaks in a PAR-dependent manner. Indeed, PARPi treatment impaired the recruitment of DNA-PKcs (Supplementary Fig. 11G), while the accumulation of the DNA damage marker NBS1 remained unaffected (Supplementary Fig. 11H, I). To further understand the interplay between ZNF384, Ku and DNA-PKcs with PARP1, epistasis analysis were performed. We found that ZNF384, DNA-PKcs, and PARP1 depletion impaired XRCC4 accumulation, which is in line with our previous results (Supplementary Fig. 12A, B and ref. 9). However, double knockdown of either ZNF384 or DNA-PKcs with PARP1 did

not result in an additive effect on XRCC4 accumulation (Supplementary Fig. 12C, D). Together these results suggest that PARP activity drives two parallel pathways for DSB repair by NHEJ, one of which relies on the ZNF384-mediated ligation of broken ends via Ku-APLF-XRCC4, the other on DNA-PKcs-XRCC4.

ZNF384 promotes DSB repair via cNHEJ. The interaction between ZNF384 and cNHEJ factors (Fig. 1d), its PARP/PAR-dependent recruitment (Fig. 2a), as well as its ability to load Ku (Fig. 4b), APLF (Fig. 6a), and XRCC4/LIG4 (Fig. 6e) at DSBs, encouraged us to assess whether ZNF384 supports DSB repair via NHEJ. To this end, we first used the well-established EJ5-GFP reporter assay, which relies on the restoration of GFP expression following repair of I-SceI endonuclease-induced DSBs that flank a puromycin gene that separates a GFP gene from a CMV promoter (Fig. 7a). Flow cytometric analysis of GFP fluorescence revealed that NHEJ was reduced following ZNF384 knockdown, which was comparable to the effect observed upon XRCC4 knockdown (Fig. 7a). Cell cycle profiles remained unaffected in these cells, ruling out the effects of cell cycle misregulation (Supplementary Fig. 13A, B). Importantly, knockdown of ZNF384 did not affect the steady-state levels of several factors involved in NHEJ (Supplementary Fig. 13C), albeit that the expression of XRCC4 was slightly reduced (Supplementary Fig. 13C). However, a semi-quantitative analysis revealed that this effect was not consistent, neither in U2OS (Supplementary Fig. 13D) nor in HeLa Flp-In cells (Supplementary Fig. 13E), suggesting that indirect effects due to transcriptional misregulation are unlikely. Furthermore, ZNF384 depletion did not have a major impact on the steady-state levels of the checkpoint kinases ATM and CHK1 (Supplementary Fig. 13F-H), nor affected the IR-induced phosphorylation of ATM (at S1981) and CHK1 (at S345) (Supplementary Fig. 13I, J), the latter of which was used as a readout for ATR activation⁴⁶. This suggests that ZNF384 does not contribute to DSB repair by regulating ATM or ATR activation.

The EJ5-GFP reporter provides a readout for total NHEJ activity, including cNHEJ and aNHEJ⁴⁷. To address whether ZNF384 specifically affects Ku70/Ku80-, APLF-, and XRCC4/LIG4-dependent NHEJ, we measured random plasmid integration into the genome via cNHEJ (Fig. 7b and refs. 9,48). Indeed, ZNF384 knockdown, similar to that of Ku80 depletion, impaired random plasmid integration, indicating an important role for ZNF384 in cNHEJ (Fig. 7b).

Next, we asked whether ZNF384 plays a unique role in cNHEJ or also affects HR. Interestingly, loss of ZNF384 only very moderately impaired HR in the well-established DR-GFP reporter (Supplementary Fig. 14A), and rendered cells only mildly



sensitive to treatment with PARPi (Supplementary Fig. 14B, C), in contrast to HR-deficient cells depleted of BRCA1⁴⁹. Given that ZNF384 is critical for Ku70/Ku80 loading at DSBs and that loss of Ku70/Ku80 has been linked to increased DNA-end resection and HR levels^{50,51}, we assessed whether ZNF384 affects DNA-end resection. Cells depleted of ZNF384 did not show a significant

difference in RPA foci number and foci intensity (Supplementary Fig. 14D–G), which is consistent with the fact that ZNF384 loss did not impact HR (Supplementary Fig. 14A). Ku80-depleted cells also did not show changes in DNA-end resection (Supplementary Fig. 14D–G), which is in agreement with another report showing that end resection remained unaffected in *Ku70/Ku80* double KO

Fig. 5 The C2H2 motifs and N-terminus of ZNF384 are required for Ku70/Ku80 loading at DSBs. **a** Pull-downs of the indicated GFP fusion proteins in U2OS Flp-In/T-Rex cells. Blots were probed for Ku70, Ku80, Tubulin, and GFP. The data shown represent three independent experiments. **b** In vitro Ku80 pull-down in the presence or absence of His-Ku70/Ku80 and His-MBP, His-MBP-ZNF384, or His-MBP- Δ N-terminus. Control IP contained beads only. Blots were probed for Ku80 and MBP. The data shown represent two independent experiments. **c** Western blot analysis of the expression of endogenous ZNF384 and ectopic GFP-ZNF384 full-length and deletion mutants. Tubulin is a loading control. The asterisk (*) indicates endogenous ZNF384. The data shown represent three independent experiments. **d** Accumulation of endogenous Ku80 at 365 nm UV-A tracks in BrdU-sensitized U2OS Flp-In/T-Rex cells expressing siRNA-resistant doxycycline (dox)-inducible GFP-ZNF384, GFP-ZNF384 Δ C2H2, and GFP-ZNF384 Δ N-terminus following transfection with the indicated siRNAs. Cells were subjected to laser micro-irradiation and 10 min later fixed and immunostained. White triangles indicate irradiated regions (upper panel). Quantification of endogenous Ku80 levels in laser tracks is presented as \pm SEM of >150 cells acquired in 3 independent experiments (lower panel). **e** As in (d), except for PAR (upper panel). Quantification of endogenous PAR levels in laser tracks is presented as the mean \pm SEM from three independent experiments. Data were normalized to siLuc, which was set to 100% (lower panel). Statistical significance was calculated using the unpaired Student's *t* test, assuming unequal variances. Scale bar 5 μ m. Source data are provided as a Source Data file.

MEF cells⁵². Corroborating these findings, we observed that the accumulation of the core HR protein RAD51 into DSB-containing foci induced by IR was not affected in ZNF384-depleted S-phase cells (Supplementary Fig. 14H). Together these results suggest that ZNF384 does not play a major role in DSB repair via HR, but rather promotes cNHEJ.

When cNHEJ is compromised, DSB repair mostly occurs via aNHEJ, causing a loss of accurate end-joining and a switch to error-prone repair due to deletion formation and microhomology usage⁵³. To test whether impaired cNHEJ in ZNF384-depleted cells impacts the mutational signature at repair junctions, we used a previously published NHEJ reporter in GC92 cells⁵⁴. This reporter consists of a CD4 gene separated from a CMV promoter by an H2Kd-CD8 cassette that is flanked by I-SceI cleavage sites. DSB induction by I-SceI expression leads to re-ligation of the CMV promoter to the CD4 gene after which repair junctions can be amplified and Sanger-sequenced (Supplementary Fig. 15A). Indeed, depletion of the cNHEJ factor Ku80 resulted in an increase in the formation of larger deletions and usage of larger stretches of microhomology (Supplementary Fig. 15B, C). Moreover, although ZNF384 depletion only caused a modest effect on the total deletion frequency, among these events the proportion of larger deletions and use of microhomology during repair was increased and resembled that observed after Ku80 depletion (Supplementary Fig. 15B, C), corroborating a role for ZNF384 in cNHEJ.

In further support of these findings, we found that ZNF384 loss impaired clonogenic survival of U2OS cells and VH10-SV40-immortalized fibroblasts following exposure to IR-induced DSBs similar to that observed after XRCC4 depletion (Fig. 7c, d and Supplementary Fig. 15D, E). Interestingly, double depletion of ZNF384 and XRCC4 did not result in an increased sensitivity to IR (Fig. 7c, d), again indicating that these proteins function epistatically to promote cNHEJ-dependent repair DSBs. Finally, we employed the Flp-In/T-Rex system to establish HeLa cells stably expressing inducible siRNA-resistant GFP-tagged ZNF384 or GFP-NLS (Fig. 7e). We found that expression of siRNA-resistant GFP-ZNF384, but not that of GFP-NLS, almost fully rescued the IR sensitivity observed after ZNF384 loss, the latter of which being comparable to that observed after XRCC4 loss (Fig. 7f). This indicates that the IR sensitivity and underlying cNHEJ defect are not caused by off-targets of the siRNAs against ZNF384. The increase in IR sensitivity likely resulted from an accumulation of unresolved DSBs, as indicated by the increase in γ H2AX foci following IR exposure of ZNF384-depleted G1 cells, which resembled the phenotype of Ku80-depleted cells (Supplementary Fig. 15F–H⁵⁵). Interestingly, Ku80 has been implicated in telomere length maintenance (Jaco, Muñoz et al., 2004⁵⁶). To study whether ZNF384 is similarly involved in this process, we performed fluorescence in situ hybridization (FISH) using a PNA probe to label all telomeres and use their intensity as a proxy for

telomere length (Fig. 7g)⁵⁷. Strikingly, knockdown of ZNF384, similar to that of Ku80⁵⁶, significantly reduced telomere length in metaphase spreads when compared to that in control cells (Fig. 7h, i). Collectively, our results demonstrate that ZNF384 promotes efficient DSB repair via cNHEJ and is involved in telomere length maintenance (Fig. 7j).

Discussion

In this study, we uncover an important role of the poorly characterized ZnF protein ZNF384 in DSB repair via cNHEJ (Fig. 7j). First, we demonstrate that ZNF384 is recruited to sites of DNA damage and interacts with Ku70/Ku80 and PARP1. Second, we show that ZNF384 recruitment requires PARP1/PAR-dependent chromatin remodeling, which promotes the binding of ZNF384 to the exposed DNA via its C2H2 motifs. Third, ZNF384 stimulates the binding of Ku70/Ku80 at DNA breaks, on the one hand through physical interaction with this complex, and on the other hand through its affinity for DNA. This way, it promotes the assembly of a functional cNHEJ complex that includes APLF and the XRCC4/LIG4 complex. Finally, ZNF384 promotes NHEJ in EJ5-GFP reporter assays and random plasmid integration assays, and functions epistatically with both Ku and XRCC4 during this repair process. Thus, ZNF384 functions as an “adaptor station” for the proper assembly of repair proteins at DSBs, thereby promoting efficient repair by cNHEJ (Fig. 7j).

PARP1/PAR-dependent chromatin unfolding allows ZNF384 binding to damaged DNA.

Our findings reveal that ZNF384 is recruited to sites of DNA damage following chromatin unfolding driven by the activity of PARP1, but not PARP2 or PARP3. Several other cNHEJ repair proteins, including Ku70/Ku80 and XRCC4, are also recruited in a manner dependent on the activity of PARP1. This may involve their binding to PARP1-associated PAR chains or to the damaged DNA itself^{9,58}. Using three independent approaches, we confirmed that ZNF384 does not bind to PARP1-associated PAR chains at sites of DNA damage. Instead, ZNF384 recruitment occurs in a manner dependent on the PARP1-induced relaxation of the damaged chromatin, making the DNA available for ZNF384 to bind via its C2H2 DNA-binding motif. This is consistent with other reports showing that ZNF384 directly binds to DNA, particularly to homopolymeric dA-dT consensus sequences in vitro^{31,59}. We confirmed and extended this finding by showing that ZNF384, through its C2H2 domain, also efficiently binds dsDNA substrates containing 5'- or 3'-overhangs as opposed to dsDNA with blunt ends. DSBs with such protruding ends have been shown to be preferentially repaired by cNHEJ, while blunt ends are mostly subjected to polymerase theta-mediated end-joining⁴⁴. Thus, the preferential binding of ZNF384 to dsDNA with 5'- or 3'-overhangs is consistent with its role in cNHEJ. However, it is important to note

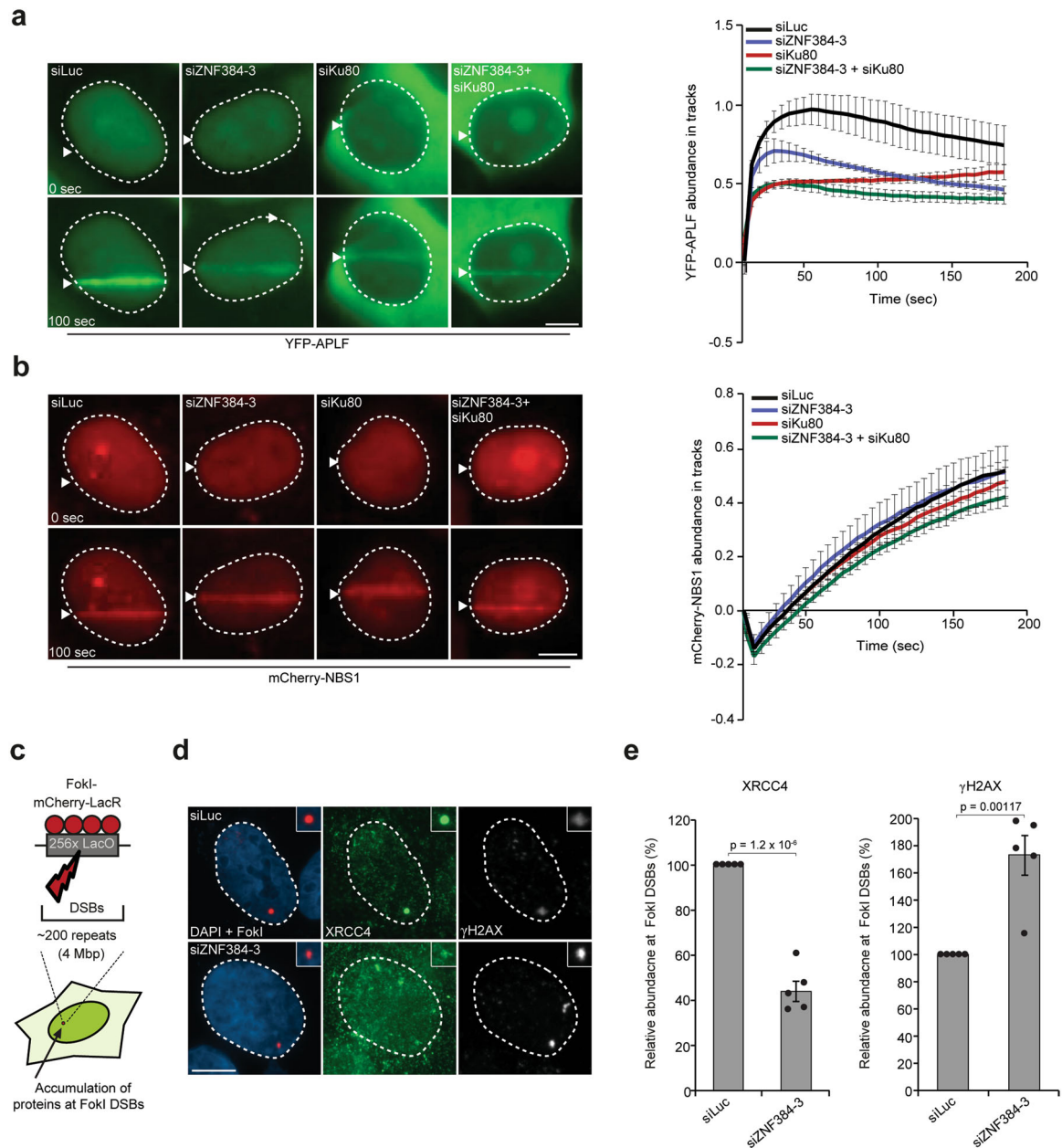
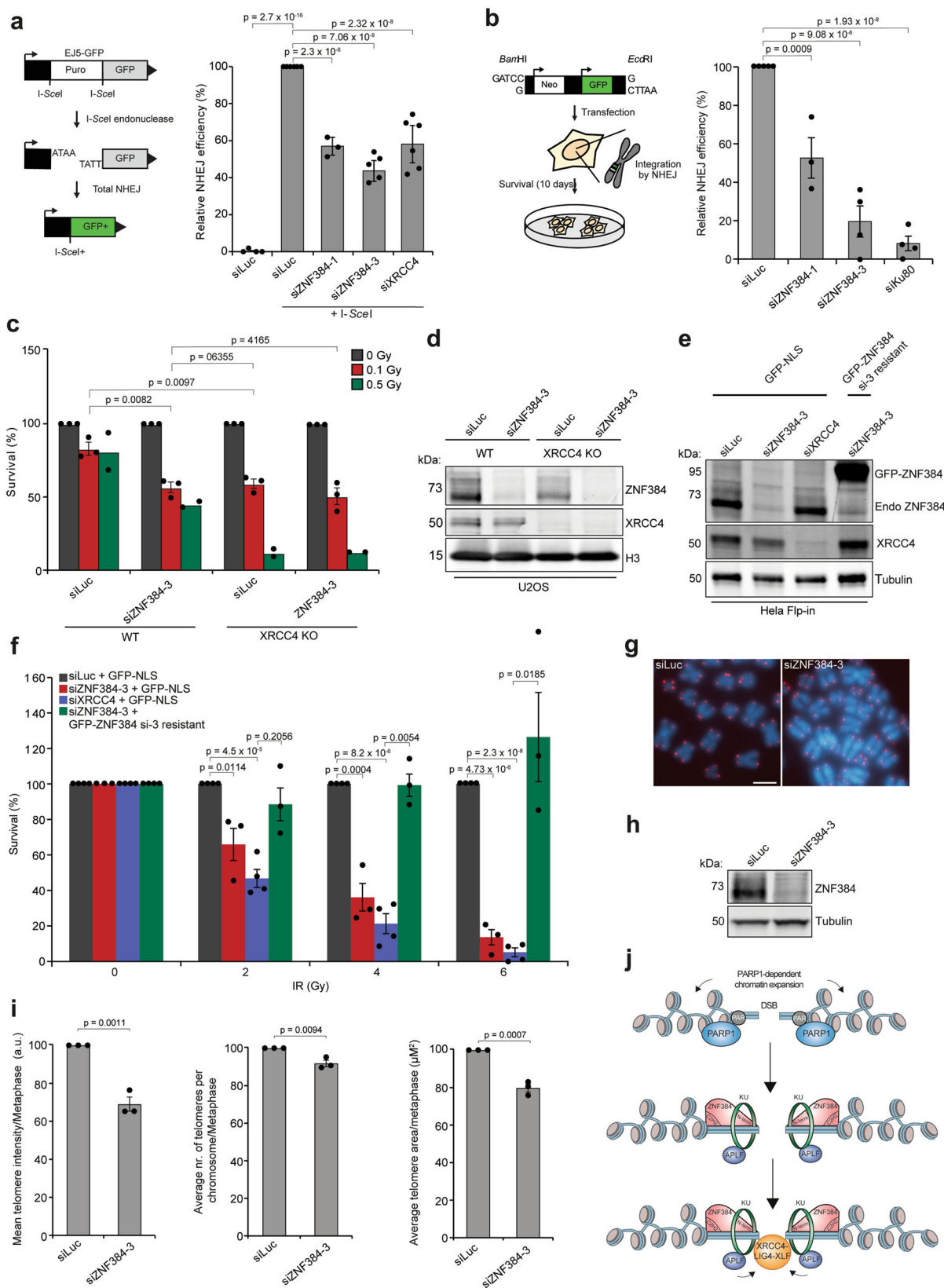


Fig. 6 ZNF384 promotes Ku-dependent loading of APLF and XRCC4/LIG4 at DSBs. **a** Live-cell imaging of the recruitment of YFP-APLF to 365 nm UV-A tracks in BrdU-sensitized U2OS cells transfected with the indicated siRNAs. mCherry-NBS1, which was co-expressed with YFP-APLF, served as a DNA damage marker. Representative images are shown. White triangles indicate irradiated regions (left panel). Quantification of data is presented as the mean values \pm SEM from 60 cells acquired in three independent experiments (right panel). **b** As in **(a)**, except for mCherry-NBS1 (left panel). Quantification of data is presented as the mean values \pm SEM from 60 cells acquired in three independent experiments (right panel). **c** Schematic of the system in U2OS 2-6-3 cells used to locally induce multiple DSBs upon tethering of the FokI endonuclease. **d** Accumulation of XRCC4 (green) to γ H2AX-marked (white) DSBs induced by FokI-mCherry-LacR at a LacO array (red) in cells transfected with the indicated siRNAs. **e** Quantification of XRCC4 and γ H2AX in cells from **(d)** is presented as the mean \pm SEM of >200 cells acquired in five independent experiments. Data were normalized to siLuc control which was set to 100%. Statistical significance was calculated using the two-tailed unpaired Student's *t* test, assuming unequal variances. Scale bar 5 μ m. Source data are provided as a Source Data file.

that the DNA substrates used in our study also contain T-rich consensus sequences. These sequences are considered the most abundant simple repetitive motifs in the human genome that are frequently expanded due to DNA replication slippage⁶⁰. The fact that DSBs can occur throughout the genome, including at homopolymeric dA-dT repeats, raises the question whether the C2H2 DNA-binding domain of ZNF384 binds to a specific DNA context or binds to lesions in any given sequence context, the latter of which would be in line with a more general role of

ZNF384 in cNHEJ. Elucidating the nature of its DNA sequence-specific binding mode will be key in further unraveling how ZNF384 acts at DSBs to promote cNHEJ.

ZNF384 serves as a “Ku-adapter” at sites of DNA damage. ZNF384 promotes the accumulation of Ku70/Ku80, but not their retention at sites of damage. This raises the question how the recruitment of these proteins is regulated at the level of DNA



binding. FCS analysis revealed that ZNF384 had a significantly higher residence time compared to Ku70, suggesting that ZNF384 binds stronger to DNA as compared to Ku70. Moreover, ZNF384 stimulates the binding of Ku70/Ku80 on DNA in vitro, suggesting that ZNF384 is the dominant binding force within the ZNF384-Ku complex, in which it serves as a platform that assists

in the positioning of Ku70/Ku80 on DNA. Indeed, we identified two regions in ZNF384 that contribute to Ku70/Ku80 recruitment at sites of DNA damage: the N-terminus, which mediates the interaction with Ku70/Ku80, and the internal C2H2 motifs, which ensure DNA binding. The region in Ku70/Ku80 that is responsible for the Ku-ZNF384 interaction, as well as its relevance for

Fig. 7 ZNF384 promotes DSB repair via cNHEJ. **a** Schematic of the EJ5-GFP reporter for NHEJ (left panel). Quantification of EJ5-GFP-positive U2OS cells transfected with the indicated siRNAs and I-SceI expression vector. I-SceI transfection was corrected by co-transfection with mCherry expression vector. The mean \pm SEM of 3–5 independent experiments is shown (right panel). Data were normalized to the siLuc control which was set to 100%. **b** Schematic of the random plasmid integration assay (left panel). Quantification of plasmid integration efficiencies in U2OS cells transfected with the indicated siRNAs (right panel). The mean \pm SEM of 3–6 independent experiments is shown. Data were normalized to siLuc control which was set to 100%. **c** Relative survival efficiency in WT and XRCC4 KO U2OS cells transfected with the indicated siRNAs and exposed to the indicated doses of IR. The mean \pm SEM of 2–3 independent experiments is shown. Data were normalized to unirradiated conditions and set to 100%. **d** Western blot analysis of the expression of endogenous ZNF384 from cells in (c). Tubulin is a loading control. **e** Expression levels of endogenous ZNF384 and dox-inducible siRNA-resistant GFP-ZNF384 in HeLa Flp-In/TRex cells. Tubulin is a loading control. **f** Effect of inducible expression of GFP-NLS and siRNA-resistant GFP-tagged ZNF384 on the survival of stable HeLa Flp-In/TRex after transfection with indicated siRNAs and IR treatment. The mean \pm SEM of 3–4 independent experiments is shown. Data were normalized to siLuc control which was set to 100%. **g** Representative FISH images of metaphases from HCT116 cells transfected with the indicated siRNAs. Scale bar 5 μ m **h** Western blot analysis of the expression of endogenous ZNF384 from cells in (g). Tubulin is a loading control. **i** Quantifications per metaphase from (h) are presented as the mean \pm SEM of 75 chromosomes acquired in three independent experiments. Data were normalized to siLuc control, which was set to 100%. **j** Model for how ZNF384 works as an adaptor of Ku to DNA during DSB repair by cNHEJ (see text for details). All *P* values were calculated using the two-tailed unpaired Student's *t* test, assuming unequal variances. Source data are provided as a Source Data file.

cNHEJ, remains to be established. Collectively, these findings suggest that ZNF384 may act as a “Ku-adaptor” that (1) senses DNA damage, (2) binds to DNA upon PARP/PAR-induced chromatin relaxation, and (3) guides Ku70/Ku80 for efficient loading at DNA breaks. To further support this model, which suggests a co-operative mode of action between ZNF384 and Ku70/Ku80, future studies may focus on understanding the spatio-temporal dynamics of these proteins at individual DSBs.

ZNF384 and DNA-PKcs act redundantly during cNHEJ protein assembly. How does ZNF384 promote the proper Ku-dependent build-up of downstream NHEJ proteins at sites of DNA damage? ZNF384 and Ku80 act epistatically to promote APLF recruitment to sites of DNA damage. Moreover, a direct interaction between APLF and Ku's conserved KBM region has previously been shown to promote XRCC4 recruitment³⁷. Our data reveal that ZNF384 is not implicated in Ku-APLF complex formation, instead suggesting that ZNF384 loads XRCC4 at DSBs by promoting the recruitment of Ku70/Ku80 and thereby also APLF. Although our mass-spectrometry analysis for ZNF384-interacting proteins did not detect APLF, we cannot exclude the possibility that physical interactions between these proteins also contribute to XRCC4/LIG4-dependent cNHEJ.

Previous work suggested that XRCC4/LIG4 assembly also depends on the recruitment and activation of DNA-PKcs by Ku-bound DNA ends⁶¹. However, DNA-PKcs activity remained unaffected in ZNF384- or Ku80-depleted human cells, as well as in *Ku80* KO mouse embryonic stem cells. This raises the question whether ZNF384 and Ku70/Ku80 promote XRCC4/LIG4 accumulation independently of DNA-PKcs. Our epistasis analysis suggests that ZNF384 cooperates with Ku70/Ku80, but functions independently of DNA-PKcs to promote XRCC4 accumulation at DNA breaks. This is in line with a recent report showing that Ku and XRCC4/LIG4 are sufficient for DNA-end synapsis independently of DNA-PKcs *in vitro*⁶². Furthermore, it may be possible that APLF dictates the functional redundancy between ZNF384 and DNA-PKcs, as APLF is recruited to sites of DNA damage via Ku, PARP3^{39,40}, and ZNF384 to promote the loading of XRCC4. Finally, DNA-PKcs has been reported to have additional roles beyond NHEJ such as in mitosis, during which DNA-PKcs autophosphorylation appears to be largely independent of Ku^{63,64}. This suggests the existence of Ku and DNA-PKcs independent mechanisms and may explain the redundancy of ZNF384 and DNA-PKcs during cNHEJ. Future work may not only provide more insight into how ZNF384 functions independently of DNA-PKcs during the assembly of a functional cNHEJ repairosome, but would also help to deepen our understanding of

how DNA-PKcs function is linked to cNHEJ driven by ZNF384-Ku70/Ku80.

ZNF384 and other ZnF proteins in cNHEJ. We reveal an important role for ZNF384 in stimulating efficient cNHEJ in human cells. However, ZNF384 is not the only ZnF protein involved in cNHEJ. For instance, APLF and ZBTB24 possess distinct ZnF domains (PBZ in APLF and C2H2 in ZBTB24) that are required for the build-up of a functional NHEJ complex by binding to auto-mono(ADP-ribosyl)ated (MAR) PARP3, PARylated PARP1, or DNA, respectively, at DSBs^{18,37,65}. This suggests that the versatile substrate recognition ability by distinct domains in ZnF proteins may play an important role in the cNHEJ process. To this end, it is interesting to note that several other ZnF proteins are recruited to sites of DNA damage in a PAR-dependent manner¹². Although it remains to be established whether this involves direct PAR binding or binding to damaged DNA, these findings suggest that ZnF proteins may play a more important role in DNA repair than previously anticipated. Future mechanistic studies will undoubtedly improve our understanding of their crucial role in diverse biological processes, including DNA damage repair, thereby increasing our understanding of genome stability maintenance.

Methods

Cell lines. U2OS, HeLa, VH10-SV40, and SV40 T-transformed GM639 human fibroblasts cells were cultured in 5% CO₂ at 37 °C in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), and DMEM and DMEM F-12 (Ham) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. RPE1-hTERT cells expressing endogenous GFP-KU70 were a gift from Steve Jackson³⁵. U2OS cells with stably integrated EJ5-GFP or DR-GFP reporters were a gift from Jeremy Stark and Maria Jasin^{47,66}. SV40 large T-transformed GM639 human fibroblasts with a stably integrated GC92 reporter were a gift from Bernard Lopez⁵⁴. U2OS cells stably expressing cell cycle marker mKO-Cdt1 were previously generated⁹. U2OS AsiSI-ER- cells were a gift from Gaele Legube⁶⁷. U2OS 2-6-5 cells stably expressing ER-mCherry-LacR-FokI-DD were a gift from Roger Greenberg⁴¹. HeLa and stable GFP-Ku80 expressing HeLa cells were a gift from Dik van Gent (Erasmus Medical Center, Rotterdam, the Netherlands). WT and *Ku80* KO 129/Ola-derived IB10 mouse embryonic stem cells were a kind gift from Marcel Tijsterman⁴⁴. PARP1, PARP2, and PARP1/PARP2 knockout U2OS cells were a kind gift from Nicholas Lakin⁶⁸. XRCC4 knockout U2OS cells were generated by co-transfection of pKLV-U6gRNA-EF(BbsI)-PGKpuro2ABFP (Addgene) containing XRCC4 gRNA (5'-GATGACATGGCAATGGAAA-3') with pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) containing Cas9 (Addgene). ZNF384 knockout U2OS Flp-In/T-rex cells were generated by co-transfection of pKLV-U6gRNA-EF(BbsI)-PGKpuro2ABFP (Addgene) containing ZNF384 gRNA (5'-CCACCTCTGAGACAGGAGACTC-3') with pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) containing Cas9 (Addgene). HeLa Flp-In/T-Rex and U2OS Flp-In/T-Rex cells, which were generated using the Flp-In/T-Rex system (ThermoFisher Scientific), were a gift of Geert Kops (University Medical Center Utrecht, the Netherlands) and Stephen Taylor (University of Manchester, UK). These cells were used to stably express inducible versions of GFP-NLS and GFP-APLF as well as siRNA-resistant GFP-ZNF384, GFP-ΔN-terminus (1-209), GFP-ΔC2H2 (205-410)^A, GFP-ΔC-terminus (401-516)^A by co-transfection of pCDNA5/

FRT/TO-Puro plasmid encoding GFP or GFP-tagged ZNF384 and deletion mutants (5 µg), together with pOG44 plasmid encoding the Flp recombinase (1 µg). After selection on 1 µg/mL puromycin, single clones were isolated and expanded. Both HeLa Flp-In/T-Rex clones and U2OS Flp-In/T-Rex were incubated with 2 µg/mL doxycycline for 24 h to induce expression of cDNAs. All cells were authenticated by STR profiling and tested negative in routinely performed mycoplasma tests.

Chemicals. Cells were treated with Phleomycin (InvivoGen) at the indicated concentrations for 1 h and collected for further analysis. The PARP inhibitor olaparib (Selleck Chemicals) and DNA-PK inhibitor NU-7441 (Selleck Chemicals) were both used at a final concentration of 10 µM, whereas PARGi (PDD00017273, Sigma) inhibitor was used at a concentration of 25 µM. H₂O₂ was used at a concentration of 0.5 mM.

Transfections, siRNAs, and plasmids. Cells were transfected with siRNAs using RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were transfected twice with siRNAs at 0 and 24 h at a concentration of 40 nM and analyzed 48 h after the second transfection unless otherwise indicated. siRNA sequences are listed in Supplementary Table 2. Cells were transfected with plasmid DNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and analyzed 24–48 h after transfection. The expression vector for full-length human ZNF384 (pCDNA3.1-FLAG-ZNF384-WT, isoform 2 with six C2H2 motifs), which was a gift from Myriam Alcalay⁶⁹, was amplified and cloned into pCDNA5/FRT/TO-Puro as a *HindIII/KpnI* fragment (Supplementary Table 3). Deletion constructs were generated by site-directed mutagenesis PCR (Supplementary Table 3). siZNF384-3-resistant ZNF384 cDNA was generated by introducing the underlined mutations CGACAGCATAATAAGGACAAG by overlap PCR and cloned as *HindIII/KpnI* fragment into pCDNA5/FRT/TO-Puro-ZNF384-WT (Supplementary Table 2). All ZNF384 expression constructs were verified using Sanger sequencing. All other plasmids were described previously: pmCherry-PARP1⁷⁰, pmEGFP-macroH2A1.1 macrodomain¹¹, GFP-WWE (from RNF146)⁸, H2B-PTR, GFP-BZIP¹¹, GFP-CHD4 and YFP-APLF⁷¹.

Generation of DSBs by ionizing radiation (IR). IR was delivered to cells by an XlIon X-ray generator machine (200 kV, 4 mA, dose rate 1 Gy/min) or a Faxitron Cabinet X-ray System Model RX-650 (130 kVp, dose rate 1.85 Gy/min).

365 nm UV-A laser micro-irradiation. Cells were grown on 18 mm coverslips and sensitized with 10 µM 5'-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) for 24 h as described⁹. For micro-irradiation, the cells were placed in a Chamlyde TC-A live-cell imaging chamber that was mounted on the stage of a Leica DM IRBE wide-field microscope stand (Leica) integrated with a pulsed nitrogen laser (Micropoint Ablation Laser System; Andor). The pulsed nitrogen laser (16 Hz, 364 nm) was directly coupled to the epifluorescence path of the microscope and focused through a Leica 40x HCX PLAN APO 1.25–0.75 oil-immersion objective. The growth medium was replaced by CO₂-independent Leibovitz's L15 medium supplemented with 10% FCS and cells were kept at 37 °C. The laser output power was set to 72–80 to generate strictly localized sub-nuclear DNA damage. Cells were micro-irradiated (two iterations per pixel) within 5 min using Andor IQ software (version 3.6). Following micro-irradiation, cells were incubated for the indicated timepoints at 37 °C in Leibovitz's L15 and subsequently fixed with 4% formaldehyde before immunostaining. Images of fixed samples were acquired on a Zeiss AxioImager M2 or D2 wide-field fluorescence microscope equipped with ×40, ×63, and ×100 PLAN APO (1.4 NA) oil-immersion objectives (Zeiss), an HXP 120 metal-halide lamp used for excitation and the following filters: DAPI (excitation filter: 350/50 nm, dichroic mirror: 400 nm, emission filter: 460/50 nm), GFP/Alexa 488 (excitation filter: 470/40 nm, dichroic mirror: 495 nm, emission filter: 525/50 nm), mCherry (excitation filter: 560/40 nm, dichroic mirror: 585 nm, emission filter: 630/75 nm), Alexa 555 (excitation filter: 545/25 nm, dichroic mirror: 565 nm, emission filter: 605/70 nm), Alexa 647 (excitation filter: 640/30 nm, dichroic mirror: 660 nm, emission filter: 690/50 nm). Images were recorded using ZEN 2012 software (blue edition, version 1.1.0.0) and analyzed in ImageJ (version 1.48) as described previously (Luijsterburg, de Krijger et al.⁹). Briefly, the average pixel intensity of laser tracks was measured within the locally irradiated area (Idamage), in the nucleoplasm outside the locally irradiated area (Inucleoplasm), and in a region not containing cells in the same field of view (Ibackground). The level of protein accumulation relative to the protein level in the nucleoplasm was calculated as follows: ((Idamage – Ibackground)/(Inucleoplasm – Ibackground) – 1).

405 nm laser micro-irradiation. Laser micro-irradiation for local photoactivation and DNA damage induction at 405 nm was performed using a single-point scanning head (iLas2 from Roper Scientific) coupled to the epifluorescence backboard of a Nikon Ti-E inverted microscope equipped with a spinning-disk scan head CSU-X1 from Yokogawa at a rotation speed of 5000 rpm, a Plan APO ×60/1.4 N.A oil-immersion objective lens and a sCMOS ORCA Flash 4.0 camera. The fluorescence of EGFP and mCherry/activated PATagRFP were excited with lasers at 490 and 561 nm, respectively. Bandpass filters adapted to the fluorophore emission spectra were used for fluorescence detection. Images were acquired using Metamorph software (version 7.8.2.0). Cells were sensitized with media containing

0.3 µg/mL Hoechst 33342 for 1 h at 37 °C. Prior to imaging, the medium was replaced with CO₂-independent phenol red-free Leibovitz's L15 medium (Life Technologies) supplemented with 20% FCS. Cells were irradiated with a 16-µm line through the nucleus to simultaneously induce DNA damage and photoactivate PATagRFP. The 405 nm laser power was measured at the beginning of each experiment and set to 125 µW at the sample level to ensure reproducibility. For PAR-3H experiments and ZNF384 recruitment experiments, images were collected every 5 s for 10 min. For ZNF384 and WWE recruitment with late PARP inhibitor treatment, Z-stacks (1-µm steps) of irradiated nuclei were collected every 30 s for 15 min. Image collection was paused 3 min post damage and olaparib was added to the imaging media to a final concentration of 30 µM. For protein recruitment analysis, a custom-made MATLAB (MathWorks) program R2014b (version 8.4.0.150421) (available upon request). For reviewing purposes, the following link can be used: <https://github.com/sehuet/Singh-image-processing> was used to segment the site of damage (I_d) as determined by the photoactivated H2B area, the total nuclear fluorescence (I_{nd}), and an area of background outside of the cell (I_{bg}). Protein accumulation at sites of damage (A_d) was calculated as:

$$A_d = \frac{I_d - I_{bg}}{I_n - I_{bg}} \quad (1)$$

The intensity within the micro-irradiated area was then normalized to the intensity prior to damage induction. Chromatin relaxation was determined by measuring the change in thickness of the photoconverted H2B line⁸.

Multiphoton laser micro-irradiation. Cells were grown on 18-mm coverslips. For micro-irradiation, cells were placed in a Chamlyde CMB magnetic chamber and the growth medium was replaced by CO₂-independent Leibovitz's L15 medium supplemented with 10% FCS and antibiotics. Laser micro-irradiation was performed on a Leica SP5 confocal microscope equipped with an environmental chamber set to 37 °C. DNA damage-containing tracks (1.5-µm width) were generated with a Mira mode-locked titanium-sapphire (Ti:Sapphire) laser (l = 800 nm, pulse length = 200 fs, repetition rate = 76 MHz, output power = 80 mW) using a UV-transmitting 63 × 1.4 NA oil-immersion objective (HCX PL APO; Leica). Confocal images were recorded before and after laser irradiation at 5-s time interval over a period of 3–5 min. Images after multiphoton micro-irradiation of living cells were recorded using LAS-AF software (Leica, light version 1.0.0) and analyzed with ImageJ (version 1.48) as described previously⁹. The average pixel intensity of laser tracks was measured within the locally irradiated area (Idamage), in the nucleoplasm outside the locally irradiated area (Inucleoplasm) and in a region not containing cells in the same field of view (Ibackground). The level of protein accumulation relative to the protein level in the nucleoplasm was calculated as follows: ((Idamage – Ibackground)/(Inucleoplasm – Ibackground) – 1).

Ultrasoft X-ray irradiation and imaging. The U2OS Flp-In/T-Rex cells stably expressing inducible GFP-tagged ZNF384 were incubated with doxycycline (2 µM) for 2.5 h before being irradiated using the previously described ultrasoft X-ray system¹⁹. To obtain locally concentrated DSBs, a custom-designed irradiation mask with parallel apertures (2.5-µm wide) was placed between the bottom of the cell culture dishes and the X-ray source. Cells were irradiated for 10 s at 40 mA emission current and 6 KeV acceleration voltage, resulting in approximately 1000 DSBs per irradiated area. Images of cells and of the irradiation mask were collected five min after exposure. For experiments involving immunofluorescence imaging, cells were exposed as described above, without doxycycline preincubation. Five min after irradiation, cells were fixed and immunostained. Wide-field 3D images were acquired using a Leica DMi8 microscope (×63/1.4 NA) and deconvolved using Huygens Professional (version 19.10). Confocal images of immunostained cells were captured using a Leica SP8-X SMD (×63/1.4 NA).

Proximity ligation assay (PLA). U2OS AsiSI-ER cells were seeded on 12-mm coverslips and after 24 h treated with 1 µM 4-hydroxytamoxifen (4-OHT, Sigma) for 5 h to induce DSBs. Subsequently, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0.5% TritonX-100. Primary antibodies rabbit anti-53BP1 (NOVUS Biologicals NB100–304), mouse anti-γH2AX (Millipore clone JBW301), and rabbit anti-ZNF384 (ATLAS antibodies HPA004051) were used to stain selected proteins. Proximity Ligation Assay was performed with Duolink In Situ PLA Probe Anti-Mouse Plus (Sigma) and Anti-Rabbit Minus (Sigma), and with Duolink In Situ Detection Reagents Orange (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Finally, secondary antibodies anti-rabbit coupled to Alexa 488 (Invitrogen) and anti-mouse coupled to Alexa 647 (Invitrogen) were used to stain selected proteins in immunofluorescence. The number and intensity of PLA foci per cell were analyzed by the imaging software ImageJ version 1.48.

Fluorescence recovery after photobleaching of ZNF384. FRAP of GFP-tagged ZNF384 constructs was performed on a Nikon Ti-E inverted microscope equipped with a spinning-disk scan head CSU-X1 from Yokogawa at a rotation speed of 5000 rpm, a Plan APO ×60/1.4 N.A oil-immersion objective lens, and a sCMOS ORCA Flash 4.0 camera. The fluorescence of EGFP was excited with lasers at 490 nm. Bandpass filters adapted to the fluorophore emission spectra were used for fluorescence detection. Local bleaching within a 4-µm diameter circular area in the

cell nucleus was performed using a dedicated single-point scanning head (iLas2 from Roper Scientific) coupled to the epifluorescence backboard of the microscope. Images were collected at 2 images/second. To estimate fluorescence recovery kinetics, the mean fluorescence intensity inside the bleached area was measured by automatic segmentation using a custom-made MATLAB (MathWorks) program R2014b (version 8.4.0.150421) (available upon request). This routine allowed for background subtraction from the intensity measurements and correction for photobleaching due to imaging by dividing the intensity in the bleached area with the one measured for the whole nucleus. The recovery time was the time required to recover half of the fluorescence signal lost upon photobleaching.

Fluorescence recovery after photobleaching of Ku70. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) of Ku70 was performed on a Zeiss LSM880 confocal setup equipped with a Plan APO $\times 63/1.2$ N.A. water immersion objective. Samples were maintained at 37 °C using a heating chamber. GFP fluorescence was excited at 488 nm and emission was detected at 500–590 nm. DNA damage was induced in a $6 \times 2 \mu\text{m}$ area of the cell nucleus with a pulsed infrared laser set at 800 nm (Mai Tai, Spectra-Physics). Regions of interest of sizes ranging between 1 and $4 \mu\text{m}^2$ located inside the previously irradiated area were bleached using a 488-nm laser. Images of the subsequent fluorescence recovery were collected at 4 frames per second using Zen Black (version 14.0.9.201). After background subtraction, the fluorescence recovery kinetics were obtained by dividing the signal within the bleached area to the one measured in the unbleached part of the damaged region.

Fluorescence correlation spectroscopy of Ku70. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) of Ku70 was performed on a Zeiss LSM880 confocal microscope equipped with a C-Apo $\times 40/1.2$ N.A. water immersion lens. GFP fluorescence was excited with a 488 nm laser and single emitted photons at wavelengths ranging between 500 and 550 nm were detected and counted on the GaAsP spectral detector. The laser power used for FCS measurements was adjusted to minimize photobleaching. FCS acquisition lasted 30 s to reduce the noise in the auto-correlation curves. Samples were maintained at 37 °C using a heating chamber. FCS curves were detrended for slow fluctuations using Fluctuation Analyzer 4G⁷².

Mathematical models for fitting of the FRAP and FCS data. The diffusion-limited model used to fit the FRAP curves is expressed as,

$$\text{frap}(t) = e^{-\frac{t}{T_D}} \left[I_0 \left(\frac{T_D}{2t} \right) + I_1 \left(\frac{T_D}{2t} \right) \right] \quad (2)$$

where T_D is the characteristic diffusion time within the bleached area and I_0 and I_1 are modified Bessel functions of the first kind. The parameter T_D varies with the diffusion coefficient of Ku70 but also, in the case of transient interactions with DNA, it depends on the K_d of this interaction³⁶. The reaction-limited model assumes that Ku70 interacts with the DNA breaks according to the following reaction:



with *Free* and *Bound* referring to the binding state of Ku and *BS* to the break site. The mathematical expression of the reaction-limited model is then as follows:

$$\text{frap}(t) = 1 - \frac{k_{\text{on}}}{k'_{\text{on}} + k_{\text{off}}} e^{-k_{\text{off}} t} \quad (4)$$

where k'_{on} is the pseudo-first-order association rate corresponding to the product of the association rate k_{on} by the local concentration of break sites [*BS*] and k_{off} is the dissociation rate. The one-population model used to fit the correlation curves is expressed as

$$G(t) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left(1 + \frac{t}{T} \right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\omega^2 T} \right)^{-1/2} \quad (5)$$

where N is the number of tagged molecules in the focal volume, τ is the residence time in the focal volume, and ω is the structural parameter of the focal volume, which was fixed to 6. Similarly, the two-population model used to fit the correlation curves is expressed as

$$G(t) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left[f_1 \left(1 + \frac{t}{T_1} \right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\omega^2 T_1} \right)^{-1/2} + (1 - f_1) \left(1 + \frac{t}{T_2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\omega^2 T_2} \right)^{-1/2} \right] \quad (6)$$

where τ_1 and τ_2 are the residence times of the two populations in the focal volume and f_1 is the fraction of the molecules belonging to the population displaying a residence time τ_1 .

Fluorescence three-hybrid assay. Fluorescence three-hybrid/PAR-3H assays were performed as described²⁷. Briefly, GFP-tagged proteins were tethered to a genomically integrated LacO array using a LacI-GFP trap in U2OS-2B2 cells⁷³ expressing mCherry-PARP1. Cells were sensitized with Hoechst and micro-

irradiated with 405 nm light to induce DNA damage. If the GFP-tagged protein of interest is able to bind PAR, PARylated mCherry-PARP1, which is generated at sites of DNA damage, will enrich at the LacO array after DNA damage induction. The mCherry-PARP1 signal intensity at the LacO array was quantified pre and 30, 60, and 120 s post DNA damage induction. The average intensity at the LacO array was normalized to the average intensity of the nucleus and corrected for background signal.

Immunofluorescence analysis. Cells were either directly fixed with 2% formaldehyde in PBS for 20 min at room temperature (RT), or pre-extracted with 0.5% Triton-X100 (Serva) in PBS on ice for 2 min prior to fixation. Alternatively, cells were fixed, post-extracted with 0.25% Triton-X100 (Serva) in PBS and treated with 100 mM glycine in PBS for 20 min to block unreacted aldehyde groups. Cells were then rinsed with PBS and equilibrated in wash buffer (PBS containing 0.5% BSA). Antibody incubation steps and washes were in wash buffer. Primary antibodies were incubated for 1–2 h at room temperature. Detection was done using goat anti-mouse or goat anti-rabbit Ig coupled to Alexa 488, 555, or 647 (1:1500; Invitrogen Molecular probes) or Cy3-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (1:100; Jackson Immuno Research). All antibodies are listed in Supplementary Table 4. Samples were incubated with 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) and mounted in Polymount.

DSB reporter assay. U2OS 2-6-5 cells stably expressing ER-mCherry-LacR-FokI-DD⁴¹ were treated for 5 h with 1 μM Shield-1 (Clontech Laboratories UK Ltd) and 1 μM 4-hydroxytamoxifen (4-OHT, Sigma-Aldrich) to induce DSBs.

Pull-down and co-immunoprecipitation assays. GFP pull-downs were performed on U2OS Flp-In/T-Rex cells expressing GFP-NLS, GFP-ZNF384 or the indicated GFP-tagged ZNF384 mutants and on HeLa and GFP-Ku80-expressing HeLa cells, while untransfected U2OS cells were used for co-immunoprecipitation assays. Cells were lysed in EBC buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 2 mM MgCl₂, protease inhibitor cocktail tablets) with 500 units benzonase. Samples were incubated for 1 h at 4 °C under constant mixing. 50 μL input sample was collected in a separate tube and mixed with 2 \times Laemmli buffer. The cleared lysates were subjected to GFP pull-down with GFP-Trap beads (Chromotek) or immunoprecipitation using a specific antibody (or corresponding IgG control) that was conjugated to Protein G-coupled agarose beads (Millipore 16–201). The beads were then washed six times with EBC buffer and boiled in 2 \times Laemmli buffer along with the input samples. Samples were subjected to western blot analysis.

Sample preparation and mass spectrometry. For mass spectrometry, U2OS Flp-In/T-Rex cells expressing GFP-NLS and GFP-ZNF384 were pelleted and lysed in EBC-1 buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 2 mM MgCl₂, protease inhibitor cocktail tablets) with 500 units benzonase. Samples were incubated for 1 h at 4 °C under constant mixing followed by high speed centrifugation for 10 min at 4 °C. Protein concentration was measured by Qubit in the cleared lysates, equalized and transferred to tubes containing GFP-Trap beads (Chromotek). After 90 min of incubation at 4 °C under rotating condition, the beads were washed four times with EBC-2 buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and protease inhibitor cocktail tablets) and three times with 50 mM ammonium bicarbonate followed by overnight digestion using 2.5 μg trypsin at 37 °C under constant shaking. Digestion was terminated with 1% trifluoroacetic acid and centrifuged for 5 min at high speed to precipitate insoluble fractions. Consequently, C18 cartridges were prepared by washing two times with acetonitrile followed by two times with 0.1% acetic acid. Peptides were loaded on the cartridge, while bound peptides were washed two times with 0.1% acetic acid and eluted with 1 mL 80% acetonitrile/0.1% acetic acid and lyophilized.

Mass spectrometry was performed essentially as previously described⁷⁴. Samples were analyzed on a Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, Germany) coupled to an EASY-nanoLC 1000 system (Proxeon, Odense, Denmark). Digested peptides were separated using a 15-cm fused silica capillary (ID: 75 μm , OD: 375 μm , Polymicro Technologies, California, USA) in-house packed with 1.9- μm C18-AQ beads (ReproSpher-DE, Pur, Dr. Maisch, Ammerburch-Entringen, Germany). Peptides were separated by liquid chromatography using a gradient from 2 to 95% acetonitrile with 0.1% formic acid at a flow rate of 200 nL/minute for 65 min. The mass spectrometer was operated in positive-ion mode at 2.8 kV with the capillary heated to 250 °C, and in a data-dependent acquisition (DDA) mode with a top seven method. Full-scan MS spectra were obtained with a resolution of 70,000, a target value of 3×10^6 , and a scan range from 400 to 2000 m/z . Maximum Injection Time (IT) was set to 50 ms. Higher-Collisional Dissociation (HCD) tandem mass spectra (MS/MS) were recorded with a resolution of 35,000, a maximum IT of 20 ms, a target value of 1×10^5 and a normalized collision energy of 25%. The precursor ion masses selected for MS/MS analysis were subsequently dynamically excluded from MS/MS analysis for 60 s. Precursor ions with a charge state of 1 and greater than 6 were excluded from triggering MS/MS events. Three replicates were included per condition with two technical repeats each.

Mass-spectrometry data analysis. Raw mass-spectrometry files were analyzed with MaxQuant software (v1.5.5.1) as described⁷⁵ with the following modifications from default settings: the maximum number of mis-cleavages by trypsin/p was set to 3, label-free quantification (LFQ) was enabled disabling the Fast LFQ feature. The Match-between-runs feature was enabled with a match time window of 0.7 min and an alignment time window of 20 min. We performed the search against an in silico digested UniProt reference proteome for Homo sapiens (June 8, 2020). Analysis output from MaxQuant was further processed in the Perseus computational platform (version 1.5.5.3)⁷⁵. Proteins identified as common contaminants, only identified by site and reverse peptide, were filtered out, and then all the LFQ intensities were log₂ transformed. Different biological repeats of each condition were grouped and only protein groups identified in all three biological replicates in at least one condition were included for further analysis. Missing values were imputed using Perseus software by normally distributed values with a 1.8 downshift (log₂) and a randomized 0.3 width (log₂) considering total matrix values. Volcano plots were generated, and Student's *t* tests were performed to compare the different conditions. Spreadsheets from the statistical analysis output from Perseus were further processed in Microsoft Excel for comprehensive visualization and analysis of the data (Supplementary Table 1).

Western blot analysis. Cells were lysed in 2× Laemmli buffer and proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 4–12% pre-cast polyacrylamide gels (BioRad or Invitrogen) and MOPS running buffer (Invitrogen). Next, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Millipore). Protein expression was analyzed by immunoblotting with the indicated primary antibodies (Supplementary Table 3) and secondary CF680 goat anti-rabbit or CF770 goat anti-mouse Ig antibodies (1:5000, Biotium). Membranes were scanned and analyzed using an Odyssey Infrared Imaging System (Licor; V3.0) and Image Studio Lite (version 5.2). Uncropped blots are provided in the source data file.

Chromatin fractionation. Chromatin fractionation was performed using a previously published protocol⁷⁶ with few modifications. Briefly, 100,000–150,000 cells were grown per 6-cm dish for 24 h and then transfected with siRNAs. Next, the cells were treated with 500 μM phleomycin for 1 h, washed three times with PBS, and incubated in NETN extraction buffer (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-Cl pH 8, 0.5% NP-40 + proteasome inhibitors). After 15 min of incubation on ice, samples were taken for the chromatin-unbound fraction and mixed with the same amount of 2× Laemmli buffer. Cells were washed with PBS, lysed, and incubated in Laemmli buffer with benzonase for 15 min to obtain the chromatin-bound fraction. Samples were heated for 7 min at 80 °C and subjected to western blot analysis.

MBP-based protein purifications. For MBP-based purification, cultures of *Escherichia Coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL cells containing pET-His6-MBP, pET-His6-MBP-ZNF384, pET-His6-MBP-C2H2, pET-His6-MBP-N-terminus, and pET-His6-MBP-C-terminus plasmids were grown to an OD₆₀₀ of 0.3 absorbance units. To start induction of protein expression, 0.3 mM IPTG was added to the culture followed by incubation overnight at 20 °C. After centrifugation, cell pellets were frozen and stored at –80 °C. For protein purification, cell pellets were lysed in 5 ml B-per™ Bacterial Protein Extraction Reagent (ThermoFisher Scientific) supplemented with protease inhibitors (Sigma) and 15 kU rLysozyme (Merck) until the lysates were clear. The viscosity of the lysate was decreased by the addition of 125 units benzonase or sonication. The lysate was centrifuged for a centrifuge for 10 min at 21,000 × g at 4 °C in a table centrifuge 21,000 × g. For the ZNF384 FL, N-terminus and C-terminus fragments, the supernatant was loaded on a column packed with 0.75 ml Amylose Resin High Flow (NEB) installed in ÄKTA pure protein purification system (Cytiva). The column was washed with buffer A (20 mM Tris pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β-ME) and the proteins were eluted with buffer B (buffer A + 10 mM maltose). For the ZNF384 C2H2 fragment, two purification steps were performed. First, the supernatant was loaded on HiTrap SP HP Strong Cation Exchange column (Cytiva) and proteins were eluted using a linear gradient from 50 to 1000 mM NaCl in 20 mM Tris pH 7.4, 10 mM β-ME collecting 2 ml fractions. Second, the fractions containing C2H2 were loaded onto the Amylose column, followed by washing and elution with buffer A and B, respectively.

Biotinylated DNA substrates. Biotinylated DNA substrates (Supplementary Table 5) were used at a concentration of 1 pmol/μl. dsDNA substrates were made by annealing complementary oligo's (Supplementary Tables 2 and 4) in reaction buffer (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.25% Tween-20, 3.5 mM DTT, 5% glycerol). Annealing was done in a PCR machine heating for 2 min to 95 °C, then gradually cooling over a period of 45 min to 25 °C.

DNA pull-down assay. DNA-binding reactions were done at 4 °C in 40 μl reaction buffer containing 0.1% BSA, 10 pmol biotinylated DNA substrate (Supplementary Table 5), and ~50 fmol of purified MBP or the different MBP-tagged ZNF384 proteins. After 30 min, the reaction buffer containing 10 μl Dynabeads M-280 streptavidin suspension and 0.1% BSA was added and samples were incubated for 15 min at 4 °C. After this incubation, beads were washed three times using 200 μl reaction buffer and loaded on 4–12% polyacrylamide Bis-Tris gel. After

electrophoresis, proteins were blotted onto PVDF membranes for one hour at 50 Volt. Membranes were incubated at room temperature for 1 h with mouse monoclonal anti-MBP antibody (NEB), followed by 1 h incubation with goat anti-mouse HRP antibody (Bethyl Laboratories), and imaged by Al680 imager (GE) with ECL. For Ku70/Ku80 DNA-binding reactions to 3'-overhang DNA, His-MBP-ZNF384 or His-MBP, 100 fmol Ku70/Ku80 heterodimer, and 10 pmol 3'-overhang biotinylated oligo were incubated in 40 μl reaction buffer (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.25% Tween-20, 3.5 mM DTT, 5% glycerol) with 0.1% BSA for 30 min at 4 °C. After 30 min, reaction buffer containing 10 μl Dynabeads M-280 streptavidin suspension and 0.1% BSA was added and samples were incubated for 30 min at 4 °C. After this incubation, beads were washed three times with 200 μl reaction buffer, Laemmli sample buffer was added and samples were incubated for 10 min at 95 °C. For separation by electrophoresis, samples were loaded on Bolt 4–12% polyacrylamide Bis-Tris Mini Protein gel (ThermoFisher). After electrophoresis, western blotting was performed and the blots were stained using mouse anti-MBP (NEB) and rabbit anti-Ku80 (Santa Cruz) as primary antibodies and goat anti-Rabbit^{CF680} and goat anti-Mouse^{CF770} (Biotium) as secondary antibodies for detection with an Odyssey Infrared Imaging System (Licor; V3.0).

In vitro pull-down assay. Protein reactions and washing steps were all done at room temperature. In total, 15 μl Dynabeads™ M-280 Sheep anti-Mouse IgG (Thermo Scientific) were incubated with 2 μg mouse anti-Ku80 antibody (Santa Cruz) in 40 μl PBS containing 0.1% BSA for 30 min. Beads were collected using a magnetic rack. After discarding the supernatant, beads were washed with 200 μl PBS containing 0.1% BSA and incubated for 30 min with 6 pmol of recombinant His-Ku70/Ku80 (Sino Biological) in 10 μl reaction buffer (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.25% Tween-20, 3.5 mM DTT, 5% glycerol). Beads were collected and the supernatant was discarded. Beads were then washed with 200 μl reaction buffer and 10 μl of 0.2% BSA was added to the reaction buffer. After 15 min, 10 μl reaction buffer with 1 pmol of purified His-MBP-tagged protein was added and samples were incubated for 30 min. Beads were collected and the supernatant was removed. Beads were subsequently washed four times with 200 μl reaction buffer. Samples were heated in Laemmli sample buffer for 10 min at 95 °C. For electrophoresis, samples were loaded on Bolt 4–12% polyacrylamide Bis-Tris Mini Protein gel (ThermoFisher). After electrophoresis, Western blotting was performed and the blots were stained using mouse anti-MBP (NEB) and rabbit anti-Ku80 (Santa Cruz) as primary antibodies and goat anti-Rabbit^{CF680} and goat anti-Mouse^{CF770} (Biotium) as secondary antibodies for detection with an Odyssey Infrared Imaging System (Licor; V3.0).

Biolayer interferometry (BLI) measurements. BLI measurements were done on an OctedRed System (Sartorius), shaking the assay plate (1000 rpm) at 298 K. All steps were performed in BLI buffer (10 mM Tris PH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.05% (v/v) Tween-20, 0.1% (w/v) BSA, 1 mM DTT). Biotinylated DNA substrates (Supplementary Table 5) were immobilized on streptavidin sensors pre-equilibrated in BLI buffer, after which a washout in BLI buffer was done. Then, 400 nM of purified MBP or the different MBP-tagged ZNF384 proteins was used to measure the association of the analyte. The resulting data were processed using the ForteBio Data Analysis software (version 7.1.0.38).

Quantitative fluorescence in situ hybridization (FISH) of telomeres. Telomere FISH was based on a previously published protocol⁵⁷. Briefly, HCT116 cells were harvested following 2 h of colcemid (Sigma) incubation. After hypotonic swelling, cells were fixed in methanol/acetic acid, dropped on slides, and dried at 37 °C overnight. The next day slides were treated with RNase A (R4642; Sigma), pepsin (P7000; Sigma) at pH 2, followed by formaldehyde fixation, washes in PBS, dehydration in ethanol, and air drying. Hybridization mixture containing 70% formamide, 0.3 μg/ml Cy3-conjugated (C3TA2)3 peptide nucleic acid (PNA) probe in 10 mM Tris (pH 7.5) was added to the slide, after which a coverslip was added followed by DNA denaturation for 1.5 min at 80 °C. After hybridization for 2 h at room temperature, slides were washed with 70% formamide/10 mM Tris/pH 7.2, and 0.05 M Tris/0.15 M NaCl containing 0.05% Tween-20. Slides were stained with DAPI, dehydrated with ethanol, air dried, and mounted in Aquapolymount (Polysciences). Images were acquired on a Zeiss AxioImager M2 wide-field fluorescence microscope with 63x PLAN APO (1.4 NA) oil-immersion objectives (Zeiss). Integrated density and area of single telomeres were measured with ImageJ (version 1.48) by using Threshold, Polygon, and Analyze Particles functions, subsequently. While obtaining images we noticed a variation of telomere signals between metaphases and less so within one metaphase spread. Therefore, after subtraction of background values, the average integrated density per telomere of each metaphase was calculated and plotted.

DR-GFP and EJ5-GFP reporter assays. U2OS cells containing either a stably integrated copy of the DR-GFP or EJ5-GFP reporter were used to measure the repair of I-SceI-induced DSBs by HR or NHEJ^{47,66}. Briefly, DR-GFP U2OS cells or EJ5-GFP U2OS cells treated with siRNA for 48 h were co-transfected with an mCherry expression vector and the I-SceI expression vector pCBASceI⁶⁶. Forty-eight hours later, the percentage of GFP-positive cells among the mCherry-positive cells was determined by FACS on a BD LSRII flow cytometer (BD

Bioscience) using FACSDiva software version 5.0.3. An example of the gating strategy can be found in Supplementary Fig. S15I. Quantifications were performed with FACSDiva™ (BD Biosciences).

Random plasmid integration assay. U2OS cells were seeded (day 1) and transfected with siRNAs the following day (day 2). Later at day 2, the cells were transfected with 2 µg gel-purified *Bam*HI/*Eco*RI-linearized pEGFP-C1 plasmid. The cells were subsequently transfected twice with siRNAs at 24 and 36 h after the first transfection (day 3 and day 4, respectively). On day 5, cells were collected, counted, seeded, and grown in medium without or with 0.5 mg/mL G418. The transfection efficiency was determined on the same day by FACS analysis using GFP fluorescence as a measure. The cells were incubated at 37 °C to allow colony formation and medium was refreshed on days 8 and 12. On day 15, the cells were washed with 0.9% NaCl and stained with methylene blue (2.5 g/L in 5% ethanol, Sigma-Aldrich). Colonies of more than 50 cells were scored. Random plasmid integration efficiency was scored as the number of G418-resistant colonies normalized by the plating efficiency, which was determined by the number of colonies formed on plates without G418 and corrected for the transfection efficiency.

Analysis of repair junctions in the GC92 reporter. Sequence analysis of repair junctions in the GC92 reporter was performed as described⁵⁴. Briefly, GC92 fibroblasts were first transfected with siRNAs and 48 h later with the *I-Sce*I expression vector pCBASce⁶⁶. 48 h later, genomic DNA was extracted using phenol-chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v, Invitrogen). PCR was performed on the genomic DNA using the CMV1 and CD4int primers (Supplementary Table 3) to amplify repair junctions. PCR products were cloned into pGEM-T easy vector (Promega). Colony PCR was performed using M13 primers (Supplementary Table 3) on individual bacterial colonies to amplify repair junctions, which were subjected to Sanger sequencing using the M13 FW primer (Supplementary Table 3). Sequences were analyzed using a custom Sanger sequence analyzer, as described previously⁴⁴.

Cell survival assays. VH10-SV40 cells were transfected with siRNAs, trypsinized, seeded at low density, and exposed to IR. For HeLa Flp-In/T-Rex, cDNAs were expressed by adding Dox for 24 h after siRNA transfection. U2OS cells were seeded at low densities and exposed to increasing doses of olaparib. After 7 days, the cells were washed with 0.9% NaCl and stained with methylene blue (2.5 g/L in 5% ethanol, Sigma-Aldrich). Colonies of more than 20 cells were scored.

Cell cycle profiling. Cells were fixed in 70% ethanol, followed by DNA staining with 50 µg/mL propidium iodide in the presence of RNaseA (0.1 mg/mL; Sigma). Cell acquisition and quantification were performed on a BD LSR II flow cytometer (BD Bioscience) using FACSDiva software version 5.0.3.

Statistics and reproducibility. Results were confirmed in multiple cell lines or by using complementary approaches. All experiments yielding micrographs, pull-down experiments, and western blot analysis were performed independently at least twice, but often three times. The MS experiments were performed in triplicate. Statistical analysis was carried out using the two-tailed Student's *t* test ($P < 0.05$). Boxplots were generated using R (version 4.0.5) and R Studio (version 1.4.1106).

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The data that support this work are available from the corresponding author upon reasonable request. The mass-spectrometry proteomics data generated in this study and shown in Fig. 1d and Supplementary Table 1 have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (<https://www.ebi.ac.uk/pride/>)⁷⁷. Access can be obtained with the dataset identifier PDX020417. In addition, publicly available reference datasets for Homo sapiens (June 8, 2020) were used to search against an in Silico-digested UniProt reference proteome. Source data are provided with this paper.

Code availability

The code used in this work is available on Github at <https://github.com/schuet/Singh-image-processing>.

Received: 23 July 2020; Accepted: 19 October 2021;

Published online: 12 November 2021

References

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

- Symington, L. S. & Gautier, J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev. Genet.* **45**, 247–271 (2011).
- Chang, H. H. Y. et al. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 495–506 (2017).
- Bhargava, R., Onyango, D. O. & Stark, J. M. Regulation of single-strand annealing and its role in genome maintenance. *Trends Genet.* **32**, 566–575 (2016).
- Khurana, S. et al. A macrohistone variant links dynamic chromatin compaction to BRCA1-dependent genome maintenance. *Cell Rep.* **8**, 1049–1062 (2014).
- Dantuma, N. P. & van Attikum, H. Spatiotemporal regulation of posttranslational modifications in the DNA damage response. *EMBO J.* **35**, 6–23 (2016).
- Caron, P. et al. WWP2 ubiquitylates RNA polymerase II for DNA-PK-dependent transcription arrest and repair at DNA breaks. *Genes Dev.* **33**, 684–704 (2019).
- Sellou, H. et al. The poly(ADP-ribose)-dependent chromatin remodeler Alc1 induces local chromatin relaxation upon DNA damage. *Mol. Biol. Cell* **27**, 3791–3799 (2016).
- Luijsterburg, M. S. et al. PARP1 links CHD2-mediated chromatin expansion and H3.3 deposition to DNA repair by non-homologous end-joining. *Mol. Cell* **61**, 547–562 (2016).
- Gibbs-Seymour, I. et al. HPF1/C4orf27 is a PARP-1-interacting protein that regulates PARP-1 ADP-ribosylation activity. *Mol. Cell* **62**, 432–442 (2016).
- Smith, R. et al. Poly(ADP-ribose)-dependent chromatin unfolding facilitates the association of DNA-binding proteins with DNA at sites of damage. *Nucleic Acids Res.* **47**, 11250–11267 (2019).
- Izhar, L. et al. A systematic analysis of factors localized to damaged chromatin reveals PARP-dependent recruitment of transcription factors. *Cell Rep.* **11**, 1486–1500 (2015).
- Vilas, C. K. et al. Caught with One's Zinc fingers in the genome integrity cookie jar. *Trends Genet.* **34**, 313–325 (2018).
- Singh, J. K. & van Attikum, H. DNA double-strand break repair: putting zinc fingers on the sore spot. *Semin Cell Dev Biol.* **113**, 65–74 (2020).
- Cassandri, M. et al. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov.* **3**, 17071 (2017).
- Gong, F. et al. Screen identifies bromodomain protein ZMYND8 in chromatin recognition of transcription-associated DNA damage that promotes homologous recombination. *Genes Dev.* **29**, 197–211 (2015).
- Chen, G. et al. ZNF830 mediates cancer chemoresistance through promoting homologous-recombination repair. *Nucleic Acids Res.* **46**, 1266–1279 (2018).
- Nicolai, S. et al. ZNF281 is recruited on DNA breaks to facilitate DNA repair by non-homologous end joining. *Oncogene* **39**, 754–766 (2020).
- Kochan, J. A. et al. Ultra-soft X-ray system for imaging the early cellular responses to X-ray induced DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **47**, e100–e100 (2019).
- Galbiati, A., Beauséjour, C. & d'Adda di Fagagna, F. A novel single-cell method provides direct evidence of persistent DNA damage in senescent cells and aged mammalian tissues. *Aging Cell* **16**, 422–427 (2017).
- Fell, V. L. & Schild-Poulter, C. The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond. *Mutat. Res Rev. Mutat. Res.* **763**, 15–29 (2015).
- Davis, A. J., Chen, B. P. & Chen, D. J. DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair* **17**, 21–29 (2014).
- Singleton, B. K. et al. Molecular and biochemical characterization of xrs mutants defective in Ku80. *Mol Cell Biol.* **17**, 1264–1273 (1997).
- Beck, C. et al. PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic Acids Res.* **42**, 5616–5632 (2014).
- Gogola, E. et al. Selective loss of PARG restores PARylation and counteracts PARP inhibitor-mediated synthetic lethality. *Cancer Cell* **33**, 1078–1093.e12 (2018).
- Jungmichel, S. et al. Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Mol. Cell* **52**, 272–285 (2013).
- Smith, R., Sellou, H., Chapuis, C., Huet, S. & Timinszky, G. CHD3 and CHD4 recruitment and chromatin remodeling activity at DNA breaks is promoted by early poly(ADP-ribose)-dependent chromatin relaxation. *Nucleic Acids Res.* **46**, 6087–6098 (2018).
- Kustatscher, G. et al. Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 624–625 (2005).
- Smeenk, G. et al. Poly(ADP-ribosylation) links the chromatin remodeler SMARCA5/SNF2H to RNF168-dependent DNA damage signaling. *J. Cell Sci.* **126**, 889–903 (2013).
- Wang, Z. et al. Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribose)ation-dependent ubiquitination. *Genes Dev.* **26**, 235–240 (2012).

31. Torrungruang, K. et al. DNA binding and gene activation properties of the Nmp4 nuclear matrix transcription factors. *J. Biol. Chem.* **277**, 16153–16159 (2002).
32. Mari, P. O. et al. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18597–18602 (2006).
33. Frit, P., Ropars, V., Modesti, M., Charbonnier, J. B. & Calsou P. Plugged into the Ku-DNA hub: The NHEJ network. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **147**, 62–76 (2019).
34. Krasner, D. S. et al. Interplay between Ku and replication protein A in the restriction of Exo1-mediated DNA break end resection. *J. Biol. Chem.* **290**, 18806–18816 (2015).
35. Britton, S., Coates, J. & Jackson, S. P. A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. *J. Cell Biol.* **202**, 579–595 (2013).
36. Sprague, B. L., Pego, R. L., Stavreva, D. A. & McNally, J. G. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* **86**, 3473–3495 (2004).
37. Grundy, G. J. et al. APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes. *EMBO J.* **32**, 112–125 (2013).
38. Shirodkar, P. et al. Identification and functional characterization of a Ku-binding motif in aprataxin polynucleotide kinase/phosphatase-like factor (APLF). *J. Biol. Chem.* **288**, 19604–19613 (2013).
39. Rulten, S. L. et al. PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Mol. Cell* **41**, 33–45 (2011).
40. Nemoz, C. et al. XLF and APLF bind Ku80 at two remote sites to ensure DNA repair by non-homologous end joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 971–980 (2018).
41. Tang, J. et al. Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 317–325 (2013).
42. Lu, H. et al. DNA-PKcs promotes chromatin decondensation to facilitate initiation of the DNA damage response. *Nucleic Acids Res.* **47**, 9467–9479 (2019).
43. Blackford, A. N. & Jackson, S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. *Mol. Cell* **66**, 801–817 (2017).
44. Schimmel, J. et al. Mutational signatures of non-homologous and polymerase theta-mediated end-joining in embryonic stem cells. *EMBO J.* **36**, 3634–3649 (2017).
45. Drouet, J. et al. DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.* **280**, 7060–7069 (2005).
46. Brown, E. J. & Baltimore, D. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* **17**, 615–628 (2003).
47. Bennardo, N. et al. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet.* **4**, e1000110 (2008).
48. Galanty, Y. et al. Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* **462**, 935–939 (2009).
49. McCabe, N. et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.* **66**, 8109–8115 (2006).
50. Ronato, D. A. et al. Limiting the DNA double-strand break resectosome for genome protection. *Trends Biochem. Sci.* **45**, 779–793 (2020).
51. Lee, K. J. et al. Phosphorylation of Ku dictates DNA double-strand break (DSB) repair pathway choice in S phase. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1732–1745 (2016).
52. Shao, Z. et al. Persistently bound Ku at DNA ends attenuates DNA end resection and homologous recombination. *DNA Repair* **11**, 310–316 (2012).
53. Kabotyski, E. B. et al. Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5333–5342 (1998).
54. Taty-Taty, G. C. et al. Control of alternative end joining by the chromatin remodeler p400 ATPase. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1657–1668 (2016).
55. Rother, M. B. et al. CHD7 and 53BP1 regulate distinct pathways for the re-eligation of DNA double-strand breaks. *Nat. Commun.* **11**, 5775 (2020).
56. Jaco, I., Muñoz, P. & Blasco, M. A. Role of human Ku86 in telomere length maintenance and telomere capping. *Cancer Res.* **64**, 7271–7278 (2004).
57. Lansdorp, P. M. et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 685–691 (1996).
58. Caron, M. C. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. *Nat. Commun.* **10**, 2954 (2019).
59. Nakamoto, T. et al. CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1649–1658 (2000).
60. Dechering, K. J. et al. Distinct frequency-distributions of homopolymeric DNA tracts in different genomes. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4056–4062 (1998).
61. Costantini, S. et al. Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair* **6**, 712–722 (2007).
62. Zhao, B. et al. The essential elements for the noncovalent association of two DNA ends during NHEJ synapsis. *Nat. Commun.* **10**, 3588 (2019).
63. Jette, N. & Lees-Miller, S. P. The DNA-dependent protein kinase: a multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **117**, 194–205 (2015).
64. Douglas, P. et al. Polo-like kinase 1 (PLK1) and protein phosphatase 6 (PP6) regulate DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) phosphorylation in mitosis. *Biosci. Rep.* **34**, e00113 (2014).
65. Helfricht, A. et al. Loss of ZBTB24 impairs non-homologous end-joining and class-switch recombination in patients with ICF syndrome. *J. Exp. Med.* **217**, e20191688 (2020).
66. Pierce, A. J. et al. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev.* **13**, 2633–2638 (1999).
67. Iacovoni, J. S. et al. High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* **29**, 1446–1457 (2010).
68. Ronson, G. E. et al. PARP1 and PARP2 stabilise replication forks at base excision repair intermediates through Fbh1-dependent Rad51 regulation. *Nat. Commun.* **9**, 746 (2018).
69. Gardini, A. et al. AML1/ETO oncoprotein is directed to AML1 binding regions and co-localizes with AML1 and HEB on its targets. *PLoS Genet.* **4**, e1000275 (2008).
70. Gottschalk, A. J. et al. Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 13770–13774 (2009).
71. Mehrotra, P. V. et al. DNA repair factor APLF is a histone chaperone. *Mol. Cell* **41**, 46–55 (2011).
72. Wachsmuth, M. et al. High-throughput fluorescence correlation spectroscopy enables analysis of proteome dynamics in living cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 384–389 (2015).
73. Czarna, A. et al. Structures of Drosophila cryptochrome and mouse cryptochrome1 provide insight into circadian function. *Cell* **153**, 1394–1405 (2013).
74. Kumar, R. et al. The STUB1 RNF4 regulates protein group SUMOylation by targeting the SUMO conjugation machinery. *Nat. Commun.* **8**, 1809 (2017).
75. Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* **11**, 2301–2319 (2016).
76. Feng, W. et al. TRAP1 regulates replication fork recovery and progression via PCNA. *Cell Discov.* **2**, 16016 (2016).
77. Perez-Riverol, Y. et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–d450 (2019).

Acknowledgements

We thank Robin van Schendel and Marcel Tijsterman for the custom Sanger Sequence analyzer and help with the sequence analysis, and Dik van Gent, Stephen Taylor, Geert Kopps, Bernard Lopez, Roger Greenberg, Maria Jasin, Jeremy Stark, Nicholas Lakin, Sylvia Gelpke-Vermeulen, and Karoly Szuhai for kindly providing valuable reagents. We also thank the Microscopy-Rennes Imaging Center (BIOSIT, Université Rennes 1), a member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04), for providing access to their imaging setups, as well as S. Dutertre and X. Pinson for technical assistance with the microscopes. This research was financially supported by the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC-StG 310913 to A.C.O.V.; ERC-CoG 50364 to H.v.A.), the Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest (committees 22 and 35), the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (20161204883), the Agence Nationale de la Recherche (PRC-2018 REPAIRCHROM) and the Institut Universitaire de France (all grants to S.H.). R.S. is supported by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (PDF20181208405).

Author contributions

J.S. generated partial ZNF384 knockout cells, ZNF384 plasmids, and performed laser micro-irradiation, cell cycle profiling, pull-down, and co-immunoprecipitation experiments, as well as plasmid integration, EJ5-GFP reporter assay, and clonogenic survivals. R.S., O.D., and S.H. performed laser micro-irradiation, fluorescence three-hybrid assay, fluorescence correlation spectroscopy, and FRAP. W.W.W. performed DR-GFP, immunofluorescence, FISH, and clonogenic survivals. K.V. generated all ZNF384-deletion constructs. M.B.R. performed GC92 reporter assays, pull-down experiments, and generated ZNF384 plasmids. A.J.L.G. prepared mass-spectrometry samples, purified recombinant proteins, and performed in vitro DNA pull-down experiments. H.Q. and P.M.K. performed Ultrasoft X-ray irradiation experiments. R.Q.K. and M.L. performed BLI experiments. R.P. and A.C.O.V. performed mass-spectrometry experiments and data analysis. H.v.A. conceived and supervised the project. J.S. and H.v.A. wrote the manuscript with input and edits from all authors.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26691-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Haicovan Attikum.

Peer review information *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

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



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

© The Author(s) 2021



The N-terminal domain of TET1 promotes the formation of dense chromatin regions refractory to transcription

Audrey Lejart¹ · Siham Zentout¹ · Catherine Chapuis¹ · Ostiane D'Augustin^{1,2} · Rebecca Smith¹ · Gilles Salbert¹ · Sébastien Huet^{1,3}

Received: 9 August 2021 / Revised: 24 January 2022 / Accepted: 31 January 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

TET (ten-eleven translocation) enzymes initiate active cytosine demethylation via the oxidation of 5-methylcytosine. TET1 is composed of a C-terminal domain, which bears the catalytic activity of the enzyme, and a N-terminal region that is less well characterized except for the CXXC domain responsible for the targeting to CpG islands. While cytosine demethylation induced by TET1 promotes transcription, this protein also interacts with chromatin-regulating factors that rather silence this process, the coordination between these two opposite functions of TET1 being unclear. In the present work, we uncover a new function of the N-terminal part of the TET1 protein in the regulation of the chromatin architecture. This domain of the protein promotes the establishment of a compact chromatin architecture displaying reduced exchange rate of core histones and partial dissociation of the histone linker. This chromatin reorganization process, which does not rely on the CXXC domain, is associated with a global shutdown of transcription and an increase in heterochromatin-associated histone epigenetic marks. Based on these findings, we propose that the dense chromatin organization generated by the N-terminal domain of TET1 could contribute to restraining the transcription enhancement induced by the DNA demethylation activity of this enzyme.

Keywords Ten-eleven translocation enzyme · DNA methylation · DNA hydroxymethylation · Chromatin · Transcription · Fluorescence microscopy

Introduction

In the nucleus of eukaryotic cells, DNA is wrapped around histones to form the chromatin fiber which, itself, displays a hierarchy of folding steps. The complex organization of chromatin is essential to ensure that the entire genetic material of the cell can be contained within the nucleus, where it occupies 20 to 50% of the nuclear volume (Ou et al. 2017).

Despite this high level of packaging, the chromatin structure is not fixed and constantly evolves in relation to multiple cellular processes which require access to DNA such as transcription, replication, or repair (Fierz and Poirier 2019). Key actors in the regulation of chromatin folding are epigenetic marks such as post-transcriptional modifications found on histones and base modifications found in DNA. These dynamic marks attract or repel effectors of DNA transactions and control chromatin organization either directly, by modulating for example nucleosome stability, or indirectly, by recruiting remodelers or chromatin scaffolding proteins (Talbert and Henikoff 2017).

While epigenetic marks found on histones are extremely diverse, only a handful of modifications are found at the DNA level, the main one being 5-methylcytosine (5-mC) (Rausch et al. 2019). This mark, mainly found at CpG dinucleotides, has a repressive impact on transcription, in particular through the recruitment of repressor complexes and by regulating the binding of transcription factors to DNA at regulatory regions (Watt and Molloy 1988; Iguchi-Ariga and Schaffner 1989). 5-mC is written by several DNA

✉ Gilles Salbert
gilles.salbert@univ-rennes1.fr

✉ Sébastien Huet
sebastien.huet@univ-rennes1.fr

¹ Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) - UMR 6290, BIOSIT (Biologie, Santé, Innovation Technologique de Rennes) - UMS 3480, US 018, 35000 Rennes, France

² Institut de Biologie François Jacob, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Université Paris-Saclay, Université de Paris, CEA, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

³ Institut Universitaire de France, Paris, France

methyltransferase enzymes and its removal arises either by passive dilution due to DNA replication or by active DNA demethylation (Bhutani et al. 2011; Mulholland et al. 2020). The main active demethylation pathway is based on the successive oxidation of 5-mC into 5-hmC (5-hydroxymethylcytosine), 5-fC (5-formylcytosine), and finally 5-caC (5-carboxylcytosine), which are carried out by members of the TET (ten-eleven translocation) enzyme family (Ito et al. 2011). While the 5-fC and 5-caC forms are rapidly excised by the DNA repair machinery to restore an unmethylated cytosine (Maiti and Drohat 2011), 5-hmC has a relatively long lifetime and could thus constitute a fully fledged epigenetic mark (Münzel et al., 2011).

The TET family is composed of three members showing distinct expression patterns hinting at different cellular functions (Lorsbach et al., 2003). All members share a catalytic domain responsible for 5-mC oxidation that is localized at the C-terminus of the proteins (Tahiliani et al. 2009; Hu et al. 2013). Furthermore, TET1 and TET3, but not TET2, bear a CXXC domain that binds to unmethylated CpGs and is thought to be responsible for the localization of these proteins at CpG-rich genomic sites like CpG islands, protecting them from aberrant methylation (Tahiliani et al., 2009). By controlling the balance of 5-mC/5-hmC levels within the genome, the TET enzymes are key regulators of transcriptional processes associated with cell differentiation, tumorigenesis, and neurodegeneration (Rasmussen and Helin 2016; Jin et al. 2016). However, the role of TET enzymes is not limited to their catalytic activity. Indeed, they have been shown to serve as a binding platform for effectors that regulate transcription such as the histone methyltransferase complex PRC2 (Wu et al. 2011), the histone acetyltransferase hMOF (Zhong et al., 2017), or the O-linked N-acetylglucosamine transferase OGT (Shi et al. 2013; Bauer et al. 2015). Importantly, the existence of a shorter isoform of TET1 (TET1short) has been recently reported. While the long isoform of TET1 (TET1long) is expressed mainly in undifferentiated cells, TET1short levels seem to increase upon differentiation as well as during tumorigenesis (Zhang et al. 2016; Good et al. 2017). Despite lacking the N-terminal domain of TET1long, including the CXXC domain, TET1short is still able to demethylate CpG islands (Zhang et al. 2016). Nevertheless, TET1short cannot fully complement the longer isoform, suggesting that the N-terminal domain of the full-length protein fulfils specific cellular functions that remain to be clarified.

In the present work, we demonstrate that the N-terminal region of the TET1 protein, which is lacking in TET1short, is able to induce a global reorganization of chromatin in three different human cell lines (U2OS, HeLa, and MCF-7). This restructuring process is seen at the larger chromatin folding scales but also at the molecular level since histone exchange rates are impacted by the TET1 N-terminal

domain. We also show that the chromatin reorganization is associated with a global shutdown of transcription. Altogether, our findings uncover a previously unidentified function of TET1 in the regulation of the chromatin structure with potential consequences regarding its roles in the regulation of transcription.

Methods

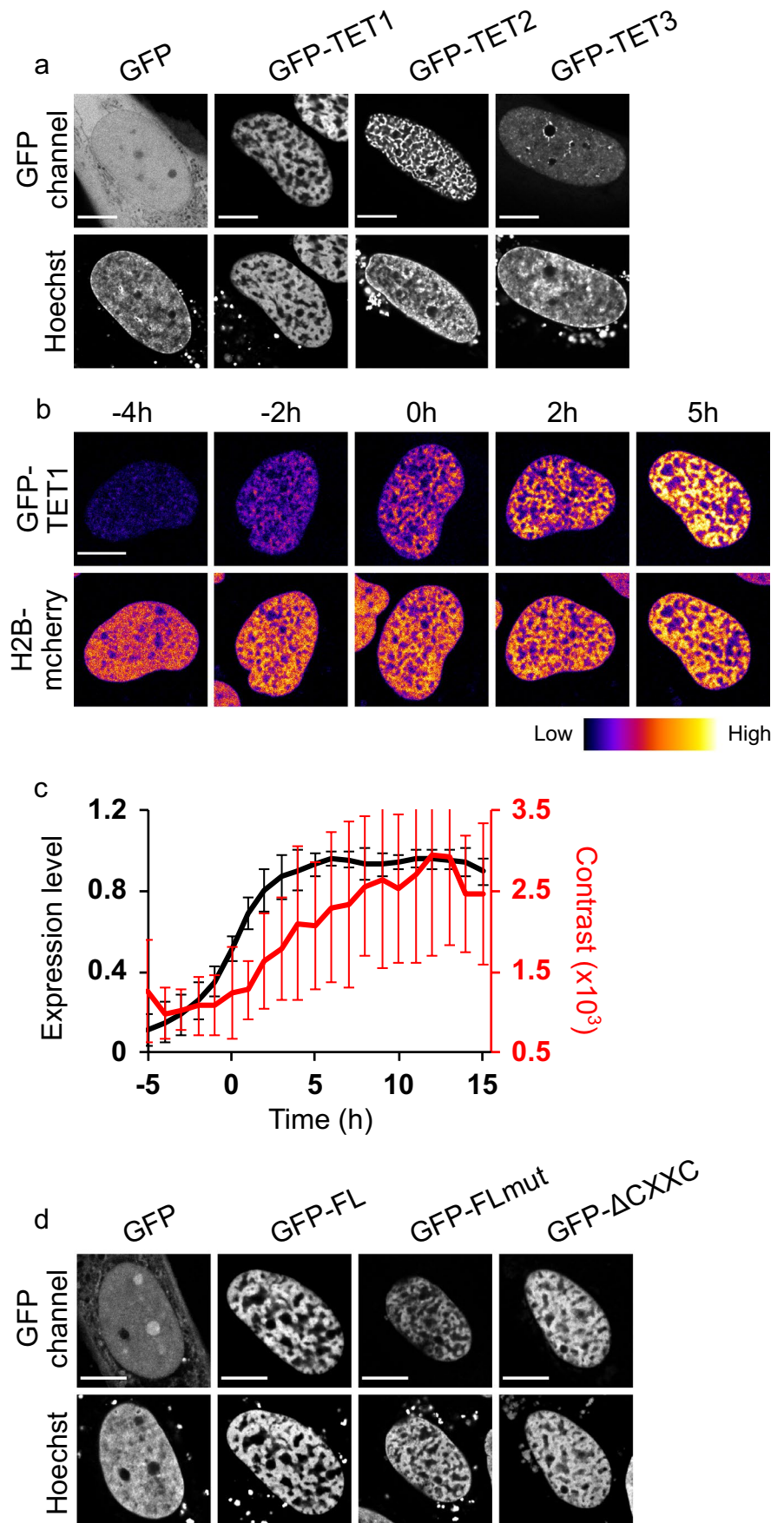
Plasmids

Plasmids coding for the full-length TET1, TET2, and TET3 tagged with GFP on their N-terminal end are gifts from Heinrich Leonhardt and Cristina Cardoso (Frauer et al. 2011). The plasmids coding for the C-terminal and N-terminal fragments of TET1, both tagged with GFP on their C-terminal end, as well as the TET1 mutant lacking the CXXC domain, tagged with GFP on its N-terminal end, were provided by Wei Xie (Zhang et al. 2016). The catalytically inactive mutant of full-length TET1 fused to GFP on its N-terminal end was obtained by site-directed mutagenesis on GFP-tagged TET1 with primers 5'-gttgatgcatgttggaatggccttgaagaatgggcacaaaaatcc-3' and 5'-ggattttgtgcccattctacaaggccattcacaacatgcacaac-3' using Phusion polymerase (Thermo Scientific). Haico Van Attikum (Rother et al. 2020) provided the plasmid coding for GFP fused to a NLS (nuclear localisation sequence), which promotes GFP accumulation in the nucleus. The H2B-mCherry was a gift from Jan Ellenberg (Euroscarf P30632 (Neumann et al. 2010)). mEGFP was cut from H1-mEGFP (gift from Gyula Timinszky) and replaced with mCherry using the restriction sites BshTI and Bsp1407I (Thermo Scientific), to generate the H1-mCherry construct.

Cell culture

The experiments were performed on three different human cell lines: osteosarcoma U2OS cells, cervical carcinoma HeLa cells, and breast cancer MCF-7 cells. All cell lines were cultured in DMEM (4.5 g/L glucose, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies), 2 mM glutamine (Sigma), 100 µg/mL penicillin, and 100 U/mL streptomycin (Sigma) in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂. For transient expression of fluorescent constructs, cells were transfected 5 h after seeding into glass-bottom chambers (Thermo Scientific and Zell Contact) with XtremeGENE HP (Roche) or Xfect (Takara Bio) according to the manufacturer's instructions. U2OS stably expressing H2B-mCherry were generated by transfection of the H2B-mCherry plasmid followed by a 2-week selection in growing medium supplemented with puromycin (0.25 µg/mL, Invivogen). Immediately prior to imaging live cells,

Fig. 1 The overexpression of GFP-TET1 leads to chromatin reorganization. **a** Images of Hoechst-stained UO2S cells expressing either unfused GFP, or GFP-tagged TET1, TET2, or TET3. Cells were imaged 24 h after transfection. More than 30 cells were imaged per condition and a typical image is shown for each of them. **b** Time-lapse image sequence of live U2OS cells stably expressing H2B-mCherry and transiently expressing GFP-TET1. The images were pseudocolored according to the look-up table displayed below the images. The timelapse acquisition started 6 h after transfection. **c** Images from **b** were quantified to monitor the changes in GFP-TET1 expression levels (black curve), assessed by GFP fluorescence intensity, in parallel to the chromatin spatial distribution, assessed by the fluorescence contrast estimated from the images of the H2B-mCherry signal (red curve). The curves show a mean \pm SD of 17 cells. Before averaging, the individual curves for the chromatin contrast and the expression level were aligned in time using as a reference the timepoint at which the normalized expression level equalled 0.5. The time was then estimated relative to this reference timepoint. **d** Images of Hoechst-stained U2OS cells expressing either unfused GFP, or full-length TET1 (GFP-FL), a catalytically inactive mutant of TET1 (GFP-FLmut), or a TET1 construct lacking the CXXC domain (GFP- Δ CXXC), all tagged with GFP. Cells were imaged 24 h after transfection. For panels **a**, **b**, and **d**, scale bars = 10 μ m



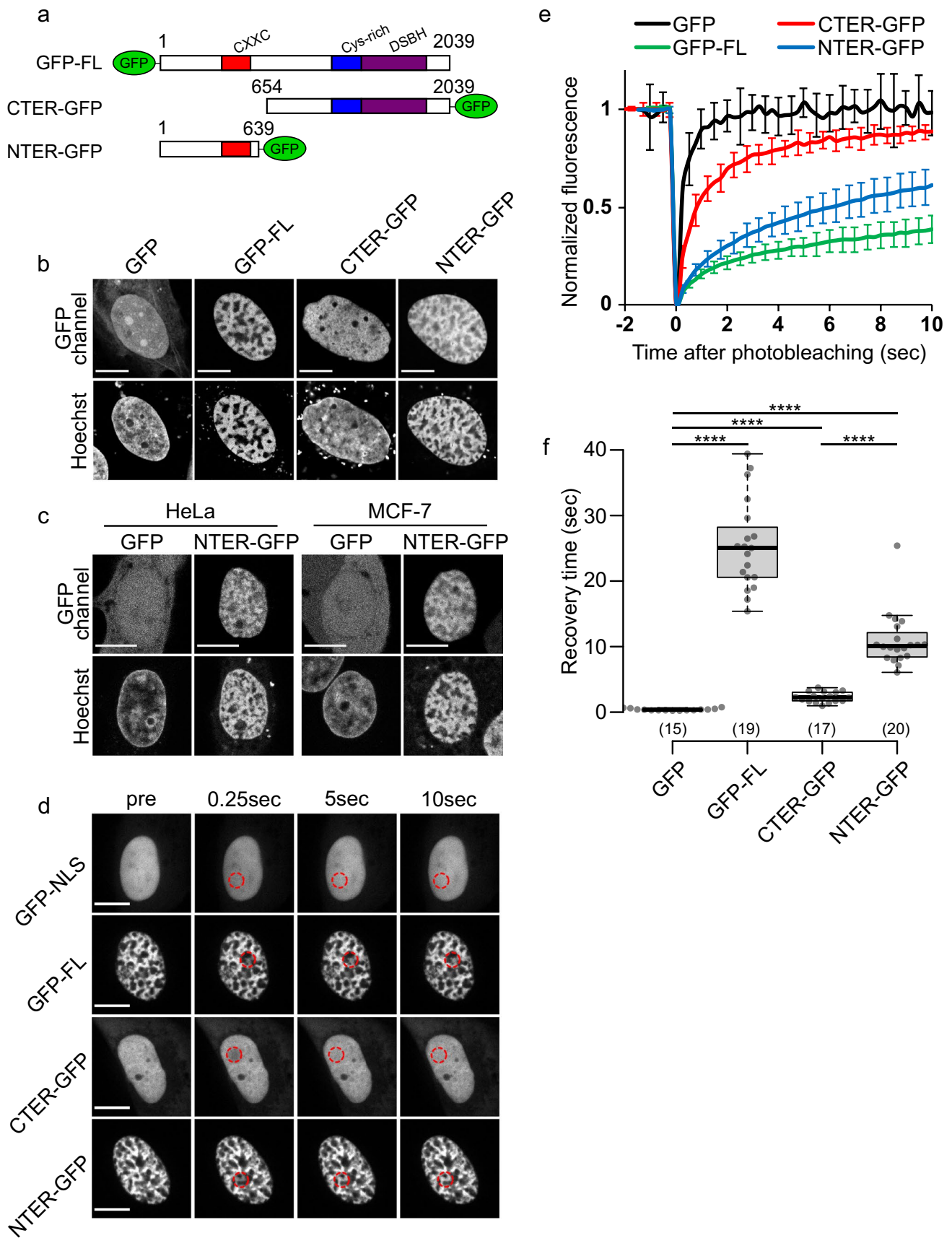


Fig. 2 The N-terminal domain of TET1 promotes chromatin reorganization. **a** Schematic representation of the GFP-tagged TET1 protein domains. Cys-rich corresponds to a cysteine-rich region and DSBH stands for double-stranded β -helix. **b** Images of Hoechst-labeled U2OS cells expressing either unfused GFP, full-length (GFP-FL), N-terminal domain (NTER-GFP), or C-terminal domain (CTER-GFP) of TET1, all tagged with GFP. More than 100 cells were imaged per condition and a typical image is shown for each. **c** Images of Hoechst-labeled HeLa and MCF-7 cells expressing unfused GFP or the N-terminal of TET1 tagged with GFP. More than 30 cells were imaged per condition and a typical image is shown for each. **d** Image sequences of the fluorescence redistribution after photobleaching a circular area of the nucleus (dotted red circles) of U2OS cells expressing either GFP fused to a nuclear localisation sequence (GFP-NLS), full-length TET1 (GFP-FL), the N-terminal domain of the protein (NTER-GFP), or its C-terminal domain (CTER-GFP), all tagged with GFP. **e** Images from **d** were quantified to assess the fluorescence recovery within the bleached region. The curves show a mean \pm SD of 15 to 20 cells for each condition. **f** Characteristic recovery times estimated from the fitting of the curves shown on panel **e**. For all the data shown on this figure, cells were imaged 24 h after transfection. For panels **b** to **d**, scale bars = 10 μ m

growth medium was replaced with CO₂-independent imaging medium (Phenol Red-free Leibovitz's L-15 medium (Life Technologies) supplemented with 20% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 μ g/mL penicillin, and 100 U/mL streptomycin). All experiments were completed with unsynchronized cells.

Immunofluorescence staining

Cells were fixed using 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100 at room temperature. For 5-hmC staining, chromatin was denatured by adding hydrochloric acid at 2 M for 30 min. Cells were blocked with blocking buffer (BSA 3% Tween 0.05% in PBS) before incubation overnight at 4 °C with primary antibodies recognizing double-strand DNA (Abcam, ab27156), 5-hmC (Active Motif, ref 39769), or the trimethylation of histone H3 at lysine 27 (Upstate, ref 07-449), diluted in the blocking buffer. The secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 555 (Thermo Scientific, ref A21428) diluted in blocking buffer were added for 1 h at room temperature. DNA was stained for 15 min with Hoechst 33342 at 1 μ g/mL (Thermo Scientific).

Nascent RNA staining by 5-ethynyl uridine

For nascent RNA staining, cells were incubated with 5-ethynyl uridine (EU) at 1 mM in culture medium for 1 h before being fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15 min before RNA was labeled using the Click-iT® RNA Alexa Fluor 594 Imaging Kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific).

Confocal imaging and fluorescence recovery after photobleaching

Fluorescence imaging of live and fixed cells was on a LSM880 point-scanner confocal microscope (Zeiss) using a 60 \times /1.4 N.A. oil-immersion objective lens. The pinhole was set to one Airy unit and fluorescence detection was performed on a GaAsP detector array. The fluorescence of the Hoechst was excited at 405 nm and detected within a window ranging from 415 to 470 nm. The fluorescence of the GFP was excited at 488 nm and detected within a window ranging from 500 to 550 nm. The fluorescence of the mCherry and Alexa Fluor 555 was excited at 561 nm and detected within a window ranging from 580 to 650 nm. The fluorescence of the Alexa Fluor 594 was excited at 594 nm and detected within a window ranging from 605 to 695 nm. The pixel size was set to 70 nm. Laser intensities and detector gains were chosen to avoid detector saturation and the acquisition settings were kept constant within the course of a given experiment. FRAP of H2B-mCherry was performed on the same setup. Photobleaching was achieved by 30 iterations of scanning half the nucleus at 100% power of the 561 nm laser. Then, cells were imaged for 11 h at 1 image per hour to monitor the progressive recovery within the bleached area. FRAP of H1-mCherry as well as the full-length or truncated forms of TET1 tagged with GFP was completed on a Ti-E inverted microscope from Nikon equipped with a CSU-X1 spinning-disk head from Yokogawa, a Plan APO 60 \times /1.4 N.A. oil-immersion objective lens, and a sCMOS ORCA Flash 4.0 camera. A 4 μ m-diameter circle within the nucleus was bleached by 40 consecutive scans at 100% of 561 or 488 nm and subsequent fluorescence recovery was monitored by imaging the cells for 25 to 50 s at 4 frames/second. For all live-cell experiments, cells were maintained at 37 °C with a heating chamber.

Image analysis

Image analysis was performed using the ImageJ software. For the quantification of fluorescence signals, the mean intensity within manually defined region delineating the nucleus was measured and subtracted from background. Colocalization between two channels was performed by calculating the Pearson coefficient using the JACoP plugin (Bolte and Cordelières 2006). To assess chromatin compaction, we estimated the fluorescence contrast on images of nuclei expressing H2B-mCherry or stained with Hoechst, using the plugin GLCM_Texture written by Julio E. Cabrera. The contrast is one of the Haralick features (Haralick et al. 1973) and measures the mean-squared intensity difference between pixels separated by a given distance d . This distance

d was set to 10 pixels, which corresponded to the characteristic size of the dense chromatin domains generated by TET1 overexpression. Since we found that the measured contrast was independent of the cardinal directions, this parameter was only calculated along the east direction. The contrast estimated for each nucleus was the average of the values measured for three regions of 20*20 pixels randomly chosen within this nucleus, taking care that these regions do not overlap with the nucleus border or the nucleoli. For the timelapse acquisitions shown on Figs. 1b and S1b, the changes in fluorescence contrast were measured from the images of the H2B-mCherry patterns and the levels of expression of unfused GFP or GFP-TET1 were assessed by the mean intensity in the GFP channel. The expression level was then rescaled to range between 0 and 1. Before averaging, the individual curves for the chromatin contrast and the expression level were aligned in time using as a reference the timepoint at which the normalized expression level equalled 0.5. The time was then estimated relative to this reference timepoint.

To analyze the FRAP acquisitions, regions of interest were defined manually to measure the fluorescence intensities within the bleached area (I_{bleach}), the whole nucleus (I_{nuc}), and outside the cell (I_{bg}), along the entire image sequence. Based on these intensity measurements, the intensity within the bleached area was corrected from background and from the loss of total nuclear intensity due to both local photobleaching and timelapse imaging (Bancaud et al., 2010), using the following expression:

$$I_{frap} = \frac{I_{bleach} - I_{bg}}{I_{nuc} - I_{bg}}$$

After subtracting the signal estimated immediately after the bleach, the intensity was normalized to the pre-bleach signal. To estimate the characteristic recovery time, the post-bleach curves were fitted with the following single-exponential recovery model:

$$I_{rec}(t) = 1 - \exp(-t/\tau)$$

with t the time after bleaching and τ the fitted characteristic recovery time.

Flow cytometry

For staining with the Click-iT® RNA reagent (Thermo Scientific), U2OS cells were seeded into 6-well plates and transfected with the corresponding GFP-tagged TET1 expression plasmid. After 16 h, cells were treated for 1 h at 37 °C with 1 mM of 5-ethynyl uridine diluted in DMEM medium. Then, cells were harvested by trypsinization and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min

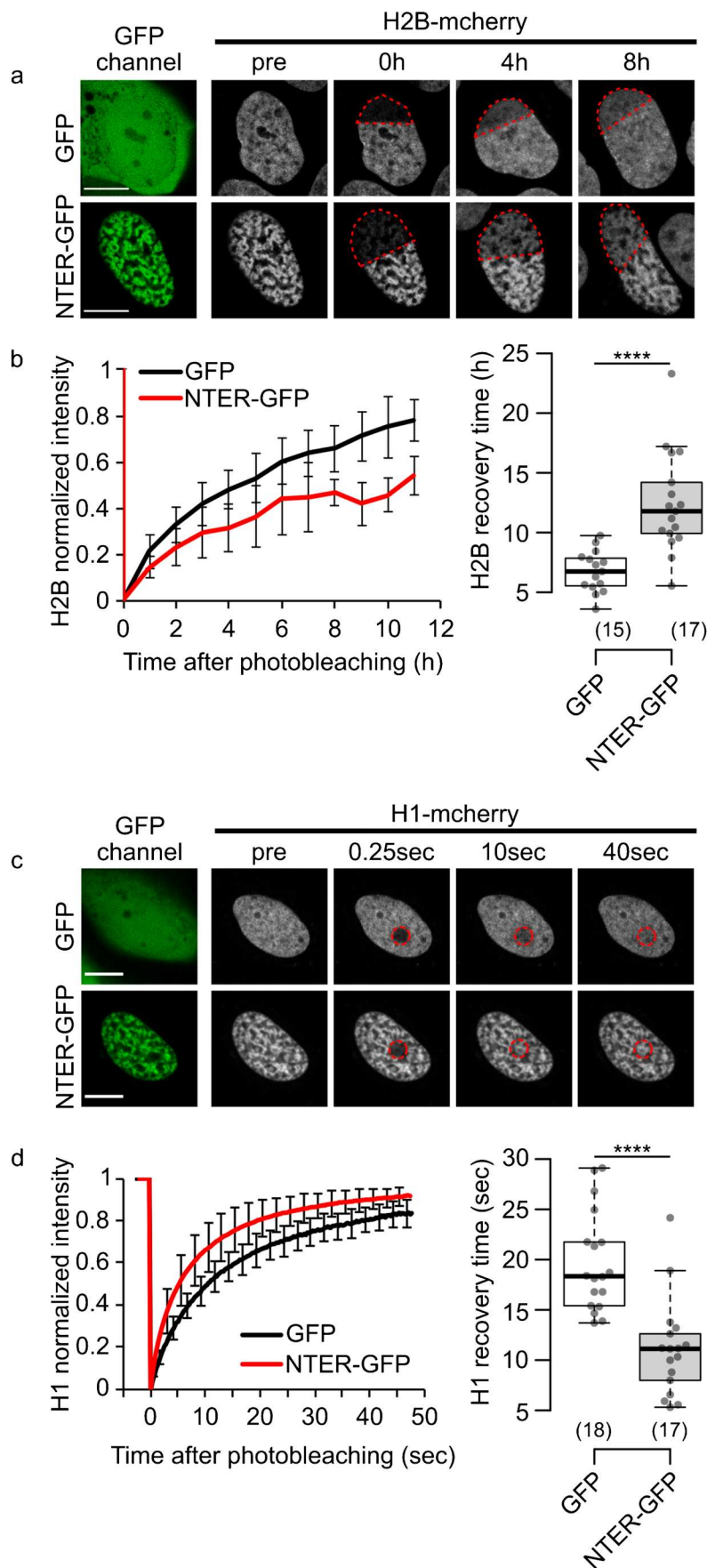
at room temperature. After permeabilization for 15 min using the Click-iT® saponin-based permeabilization reagent, the cells were stained with the click-chemistry cocktail according to the manufacturer's instructions for 30 min at room temperature and protected from light. For H3K27me3 staining, U2OS cells were seeded into 6-well plates and transfected with the corresponding GFP-tagged TET1 expression plasmid. After 16 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with saponin-based permeabilization reagent, and incubated with rabbit polyclonal antibody against H3K27me3 (Sigma-Aldrich, 07-449) for 1 h at 1/100 dilution in the permeabilization reagent. After three cycles of washes/centrifugation with the permeabilization buffer, the pellet was resuspended and stained for 30 min using a 1/1000 dilution of Alexa Fluor 647 secondary antibody (Thermo Scientific, A315573). Finally, the samples were washed/centrifuged three times with PBS and the pellets were resuspended with PBS for cytometry analysis.

All the conditions were analyzed on a LSRFortessa X-20 (BD Bioscience) using BD FACSDiva Software v8.0.1. GFP was excited at 488 nm laser and detected within 30 nm window centered on 530 nm. For the Click-iT® staining using Alexa Fluor 594, fluorescence was excited with a 575 nm laser and detected within a 30 nm window centered on 620 nm. Alexa Fluor 647 was excited at 640 nm laser and detected within a 30 nm window centered on 670 nm. At least 10⁵ events were collected for each condition. Quantifications were performed with the FACSDiva software (BD Biosciences).

Statistics

All the experiments were performed in at least three replicates with reproducible results for each replicate. When a single experiment is shown, a typical replicate was chosen. For the curves displaying time courses, means ± SD are shown. Boxplots were generated using a web tool developed by the Tyers and Rappsilber labs (<http://boxplot.tyerslab.com/>). The box limits correspond to the 25th and 75th percentiles and the bold line indicates the median value. The whiskers extend 1.5 times the interquartile range and outliers are shown by dots. The numbers in parentheses below each condition refer to the number of cells, for the imaging data, or to the number of experiments, for the cytometry data. p values were calculated using either two-sided unpaired Student's t -test assuming unequal variances for data showing normal distributions, or unpaired two-sample Wilcoxon test. On the boxplots, * refers to $p < 0.05$, ** to $p < 0.01$, *** to $p < 0.001$, **** to $p < 0.0001$, and n.s. to non significant.

Fig. 3 The N-terminal domain of TET1 affects the association of histones H2B and H1 with chromatin. **a** Image sequences of the fluorescence recovery after photobleaching of the mCherry signal within half of the nucleus (dotted red outlines) of U2OS cells expressing H2B-mCherry together with either unfused GFP or the N-terminal domain of TET1 (NTER-GFP) tagged with GFP. **b** Images from **a** were quantified to assess the fluorescence recovery within the bleached region (left). The curves show a mean \pm SD of 15 and 17 cells for the unfused GFP control and the NTER-GFP condition, respectively. The FRAP curves were then fitted with a single-exponential recovery model to extract the characteristic recovery times (right). **c** Image sequences of the fluorescence recovery after photobleaching of the mCherry signal within a circular area of the nucleus (dotted red circles) of U2OS cells expressing H1-mCherry together with either unfused GFP or the N-terminal domain of the protein (NTER-GFP) tagged with GFP. **d** Images from **c** were quantified to assess the fluorescence recovery within the bleached region (left). The curves show a mean \pm SD of 18 and 17 cells for the unfused GFP control and the NTER-GFP condition, respectively. The FRAP curves were then fitted with a single-exponential recovery model to extract the characteristic recovery times (right). For all the data shown on this figure, cells were imaged 24 h after transfection. For panels **a** and **c**, scale bars = 10 μ m



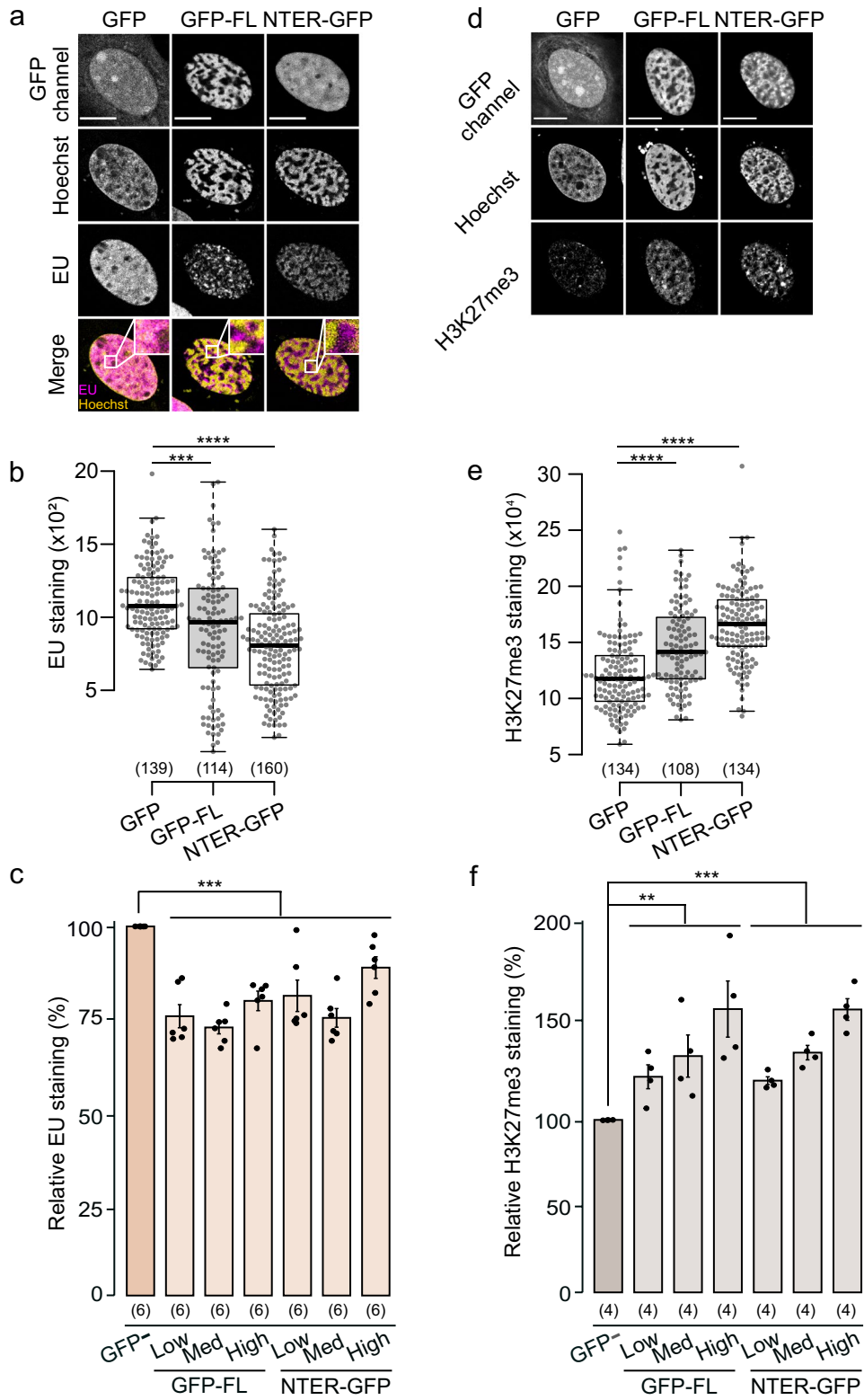


Fig. 4 The N-terminal domain of TET1 promotes transcription shutdown and H3K27me3 enrichment. **a** Images of Hoechst-stained U2OS cells expressing either unfused GFP, full-length (GFP-FL), or the N-terminal domain of TET1 (NTER-GFP), both tagged with GFP. The levels of nascent RNA were monitored by EU staining. More than 100 cells were imaged per condition and a typical image is shown for each. **b** Images from **a** were quantified to estimate the mean nuclear levels of EU staining in each condition. **c** Quantification of EU signals measured by flow cytometry in U2OS cells transfected with full-length (GFP-FL) or the N-terminal domain of TET1 (NTER-GFP), both tagged with GFP. The EU signal measured in the cells expressing these two constructs was normalized against the one measured in the GFP-negative cells (GFP-). The mean \pm SEM of 6 independent experiments is shown. **d** Images of Hoechst-stained U2OS cells expressing either unfused GFP, full-length (GFP-FL), or the N-terminal domain of TET1 (NTER-GFP), both tagged with GFP. The cells were also immunostained for the H3K27me3 histone mark. More than 100 cells were imaged per condition and a typical image is shown for each. **e** Images from **d** were quantified to estimate the mean nuclear levels of H3K27me3 in each condition. **f** Quantification of H3K27me3 signals measured by flow cytometry in U2OS cells transfected with full-length (GFP-FL) or the N-terminal domain of TET1 (NTER-GFP), both tagged with GFP. The H3K27me3 signal measured in the cells expressing these two constructs was normalized against the one measured in the GFP-negative cells (GFP-). The mean \pm SEM of 4 independent experiments is shown. For all the data shown on this figure, cells were fixed and stained 24 h after transfection. For panels **a** and **d**, scale bars = 10 μ m

Results

Overexpression of TET1 leads to a global reorganization of the chromatin structure

By using confocal fluorescence imaging, we observed that overexpression of GFP-TET1 and GFP-TET2, but not GFP-TET3, led to a global reorganization of the chromatin within the nucleus of human osteosarcoma U2OS cells as seen both by Hoechst and anti-DNA staining (Fig. 1a and S1a). While the chromatin in control cells occupied the entire nuclear space relatively evenly, the expression of GFP-TET1 and GFP-TET2 led to chromatin condensation into large bundles, leaving some nuclear areas largely devoid of staining. Since this phenotype was more pronounced for TET1, we focused on the impact of TET1 expression on chromatin structure. To better understand how chromatin reorganization arises upon TET1 overexpression, we transiently transfected GFP-tagged TET1 or free GFP in U2OS cells stably expressing H2B-mCherry and monitored the progressive increase in the GFP fluorescence levels in parallel with changes in the fluorescence contrast of the chromatin pattern, providing a read-out of the chromatin compaction state in living cells. While no significant change in the chromatin pattern was observed in cells expressing GFP (Fig. S1b, c), a rapid increase of the fluorescence contrast of H2B-mCherry was observed upon expression of GFP-TET1 (Fig. 1b, c). The tight correlation between the timing of the chromatin reorganization and the rising of TET1 levels within the nucleus suggests that the

change in the chromatin pattern is directly linked to the presence of TET1 rather than a secondary consequence of cellular mechanisms controlled by this enzyme.

TET1 is responsible for 5-mC oxidation to allow its later replacement by unmethylated cytosine (Tahiliani et al. 2009). However, when expressing a catalytically inactive form of TET1 we observed the same chromatin pattern as with the active enzyme (Fig. 1d). Furthermore, this reorganization phenotype also did not rely on the CXXC domain of TET1 (Fig. 1d). Therefore, these data show that the change in chromatin structure promoted by TET1 is not the consequence of 5-mC oxidation processes or further DNA demethylation steps.

The N-terminal domain of TET1 is sufficient to induce chromatin reorganization

To better delineate the domains of TET1 responsible for chromatin reorganization, we analyzed the impact of the expression of two truncated forms of the full-length protein: a C-terminal fragment (CTER) bearing the catalytic domain shared between the different TET proteins, and a N-terminal fragment (NTER) which remains poorly characterized except for the CXXC domain (Fig. 2a). Importantly, the CTER is reminiscent of the recently identified short isoform of TET1 found expressed in differentiated cells. While the CTER is still able to oxidize 5-mC into 5-hmC (Fig S2a, b), in line with what is reported for TET1-short (Good et al. 2017), its expression in U2OS cells did not lead to visible changes in the chromatin organization (Fig. 2b). In contrast, expression of the NTER fragment, while not affecting 5-hmC levels within the nucleus (Fig S2a, b), led to a global reorganization of the chromatin resembling the one observed when overexpressing the full-length protein (Fig. 2b). The amount of chromatin reorganization, assessed by the fluorescence contrast of the Hoechst staining, correlated with the levels of expression of the NTER fragment of TET1, similar to what was observed for the full-length protein (Fig S2c). Importantly, this chromatin restructuring phenotype upon expression of the NTER fragment was also observed in human HeLa and MCF-7 cells, demonstrating that it is not specific to U2OS cells (Fig. 2c).

We also assessed the affinity of these two truncated TET1 constructs for chromatin by monitoring the kinetics of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) for each GFP-tagged construct. The NTER fragment displayed a much slower recovery than the CTER construct (Fig. 2d–f), in agreement with previous findings showing that it is principally the NTER region that controls TET1 binding to chromatin (Zhang et al. 2016). Nevertheless, the NTER fragment appeared less bound to chromatin than the full-length TET1, which was also confirmed by a reduced colocalization of

the former with Hoechst (Fig S2d). Altogether, these results demonstrate that the dynamic association of the N-terminal domain of TET1 with chromatin, which displays characteristic exchange times of about 10 s, alters higher-order chromatin states, as shown by light microscopy, ultimately leading to a spatial redistribution of the genomic material within the nucleus.

Large-scale chromatin reorganization promoted by the N-terminal domain of TET1 is associated with changes in histone association with chromatin

We next assessed whether the changes in chromatin folding induced by the N-terminal domain of TET1 were also associated with altered dynamics of its molecular constituents. Histones are key chromatin scaffolding proteins regulating the spatial organization of the genome within the nucleus, and their exchange rates correlate with the chromatin compaction state (Misteli et al. 2000; Bancaud et al. 2009). Therefore, we assessed the impact of the N-terminal domain of TET1 on the exchange rates of two different histones: the core histone H2B as well as the linker histone H1. Using FRAP, we observed that expression of the N-terminal domain of TET1 decreased H2B exchange rate (Fig. 3a, b), in line with the fact that this domain seems to promote the local condensation of chromatin. Conversely, the linker histone H1 displayed reduced association with chromatin in cells expressing the N-terminal domain of TET1 compared to controls (Fig. 3c, d). Therefore, the dense chromatin domains generated by the expression of the N-terminal domain of TET1 differ from transcriptionally silent heterochromatic areas in which H1 displays increased binding (Misteli et al. 2000; Bancaud et al. 2009).

Expression of the N-terminal domain of TET1 leads to a global shutdown of transcription

The results obtained so far demonstrate that the N-terminal domain of TET1 regulates the architecture of chromatin at multiple scales. Since this enzyme was shown to play key roles in the regulation of transcription, we next tested whether the changes in chromatin organization induced by the N-terminal domain of TET1 were also associated with a modulation of the transcriptional state. By quantifying 5-ethynyl uridine (EU) staining both by confocal imaging and by flow cytometry to assess the level of nascent RNA in cells expressing the N-terminal domain of TET1, we found that the presence of this domain of TET1 led to a partial inhibition of transcription, similarly to the overexpression of the full-length protein (Fig. 4a–c and S3b). Furthermore, the negative colocalization between the EU and Hoechst staining in cells expressing the N-terminal domain of

TET1 suggests that transcription is confined at the interface between the dense chromatin domains and the nucleoplasm (Fig. S3a). Concomitant to the reduction in RNA synthesis rates, immunofluorescence staining also showed that the expression of the N-terminal domain of TET1 increased the levels of trimethylation of the lysine 27 of histone H3 (H3K27me3) (Fig. 4d, e), an epigenetic mark written by the PRC2 complex and found within facultative heterochromatin (Cao et al. 2002). These results were confirmed by flow cytometry, which also revealed a positive correlation between the amount the N-terminal domain of TET1 expressed in the cells and the levels of H3K27me3 mark (Fig. 4f and S3b). Altogether, these findings demonstrate that the N-terminal domain of TET1 is able to shutdown transcription by establishing a chromatin environment displaying some of the characteristics found in heterochromatin regions.

Discussion

Our data show that overexpression of TET1 promotes chromatin remodeling in three different human cell lines (U2OS, MCF-7, and HeLa), which leads to the establishment of a condensed chromatin architecture refractory to transcription. These dense chromatin domains observed in the presence of TET1 share some features found in heterochromatin, such as increased levels of H3K27me3 (Wiles and Selker 2017), but nevertheless differ from these compact regions. Indeed, while the histone linker H1 was shown to be crucial for the condensation of the chromatin fiber (Willcockson et al. 2021), we observed reduced association of this histone in the compact chromatin conformation promoted by TET1. Interestingly, senescence-associated heterochromatin foci, which arise from heterochromatic areas detaching from the nuclear lamina, also show reduced H1 binding due to its replacement by the high mobility group protein A2 (HMGA2) (Funayama et al. 2006). It would be useful to assess whether TET1 overexpression could promote cell senescence.

The TET1-mediated chromatin condensation process reported here is independent of both the catalytic activity of this enzyme and its targeting to CpG islands via the CXXC domain. The N-terminal region of the protein, which triggers this condensation, displays a strong affinity for chromatin. Therefore, it could serve as a platform to recruit factors modulating chromatin conformation, as it was recently proposed for OGT (Zhang et al. 2016). TET1 has been shown to interact with the histone-deacetylases Sin3A and HDAC1 as well as the chromatin remodeler CHD4, three actors known to promote chromatin compaction (Shi et al. 2013). Future experiments would be needed to assess whether the

recruitment of these proteins to chromatin through their binding to TET1 could contribute to the establishment of the compact genome organization observed in cells expressing the N-terminal domain of TET1. Furthermore, the increase in H3K27me3 staining in these dense domains may be promoted by the association between TET1 and the PRC2 complex (Neri et al. 2015), contributing to a global silencing of transcription.

In this work, we uncovered a new role of the N-terminal region of TET1 in the regulation of the chromatin organization and transcription inhibition. The inhibitory impact of this region of the protein might be needed to balance the positive influence of the catalytic domain on transcription, where unrestrained activity of the recently identified short isoform of TET1 is associated with tumorigenesis (Good et al. 2017). Further work will be needed to better delineate the characteristics of this coordination mechanism between the two domains of TET1.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00412-022-00769-0>.

Acknowledgements We thank the engineers of the Microscopy Rennes Imaging Center (BIOSIT, Université Rennes 1), Stéphanie Dutertre and Xavier Pinson for technical help on the microscopes. We are also grateful to the engineers of the flow cytometry facility (BIOSIT, Université Rennes 1), Laurent Deleurme and Alexis Aimé for technical assistance. This work would not have been possible without the generous donation of plasmids from Heinrich Leonhardt, Cristina Cardoso, Wei Xie, Haico Van Attikum, Gyula Timinszky, and Jan Ellenberg.

Author contribution A.L., S.Z., S.H., and R.S. completed the experiments within the manuscript. C.C. generated cell lines and DNA constructs. A.L., S.Z., S.H., and O.D.A. performed data analysis. G.S. and S.H. conceived and supervised this study. S.H. wrote the manuscript. All authors read and commented on the manuscript.

Funding This work was funded by the Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest, the Conseil Régional de Bretagne and the Institut Universitaire de France. The Microscopy-Rennes Imaging Center (BIOSIT, Université Rennes 1), is a member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

Data availability The raw datasets used during the current study are available from the corresponding authors on reasonable request.

Code availability Not applicable

Declarations

Ethics approval and consent to participate Not applicable

Consent for publication Not applicable

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Bancaud A, Huet S, Daigle N et al (2009) Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J* 28:3785–3798. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.340>
- Bancaud A, Huet S, Rabut G, Ellenberg J (2010) Fluorescence perturbation techniques to study mobility and molecular dynamics of proteins in live cells: FRAP, photoactivation, photoconversion, and FLIP. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:pdb.top90. <https://doi.org/10.1101/pdb.top90>
- Bauer C, Göbel K, Nagaraj N et al (2015) Phosphorylation of TET proteins is regulated via O-GlcNAcylation by the O-Linked N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J Biol Chem* 290:4801–4812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.605881>
- Bhutani N, Burns DM, Blau HM (2011) DNA demethylation dynamics. *Cell* 146:866–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.042>
- Bolte S, Cordeliers FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224:213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Cao R, Wang L, Wang H et al (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298:1039–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1076997>
- Fierz B, Poirier MG (2019) Biophysics of chromatin dynamics. *Annu Rev Biophys* 48:321–345. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-032847>
- Frauer C, Rottach A, Meilinger D et al (2011) Different binding properties and function of CXXC zinc finger domains in Dnmt1 and Tet1. *PLoS ONE* 6:e16627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016627>
- Funayama R, Saito M, Tanobe H, Ishikawa F (2006) Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 175:869–880. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604005>
- Good CR, Madzo J, Patel B et al (2017) A novel isoform of TET1 that lacks a CXXC domain is overexpressed in cancer. *Nucleic Acids Res* 45:8269–8281. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx435>
- Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I (1973) Textural features for image classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 3:610–621. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1973.4309314>
- Hu L, Li Z, Cheng J et al (2013) Crystal structure of TET2-DNA complex: insight into TET-mediated 5mC oxidation. *Cell* 155:1545–1555. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.020>
- Iguchi-Aruga SM, Schaffner W (1989) CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 3:612–619. <https://doi.org/10.1101/gad.3.5.612>
- Ito S, Shen L, Dai Q et al (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333:1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>
- Jin S-G, Zhang Z-M, Dunwell TL et al (2016) Tet3 reads 5-carboxylcytosine through its CXXC domain and is a potential guardian against neurodegeneration. *Cell Rep* 14:493–505. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.044>
- Lorsbach RB, Moore J, Mathew S et al (2003) TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia* 17:637–641. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402834>
- Maiti A, Drohat AC (2011) Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem* 286:35334–35338. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.284620>
- Misteli T, Gunjan A, Hock R et al (2000) Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 408:877–881. <https://doi.org/10.1038/35048610>

- Mulholland CB, Nishiyama A, Ryan J et al (2020) Recent evolution of a TET-controlled and DPPA3/STELLA-driven pathway of passive DNA demethylation in mammals. *Nat Commun* 11:5972. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19603-1>
- Münzel M, Globisch D, Carell T (2011) 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:6460–6468. <https://doi.org/10.1002/anie.201101547>
- Neri F, Incarnato D, Krepelova A et al (2015) TET1 is controlled by pluripotency-associated factors in ESCs and downmodulated by PRC2 in differentiated cells and tissues. *Nucleic Acids Res* 43:6814–6826. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv392>
- Neumann B, Walter T, Hériché J-K et al (2010) Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature* 464:721–727. <https://doi.org/10.1038/nature08869>
- Ou HD, Phan S, Deerinck TJ, et al (2017) ChromEMT: visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* 357:. <https://doi.org/10.1126/science.aag0025>
- Rasmussen KD, Helin K (2016) Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev* 30:733–750. <https://doi.org/10.1101/gad.276568.115>
- Rausch C, Hastert FD, Cardoso MC (2019) DNA Modification readers and writers and their interplay. *J Mol Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.018>
- Rother MB, Pellegrino S, Smith R et al (2020) CHD7 and 53BP1 regulate distinct pathways for the re-ligation of DNA double-strand breaks. *Nat Commun* 11:5775. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19502-5>
- Shi F-T, Kim H, Lu W et al (2013) Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by O-linked N-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 288:20776–20784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460386>
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y et al (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324:930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Talbert PB, Henikoff S (2017) Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:115–126. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.148>
- Watt F, Molloy PL (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* 2:1136–1143. <https://doi.org/10.1101/gad.2.9.1136>
- Wiles ET, Selker EU (2017) H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Curr Opin Genet Dev* 43:31–37. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.11.001>
- Willcockson MA, Heaton SE, Weiss CN et al (2021) H1 histones control the epigenetic landscape by local chromatin compaction. *Nature* 589:293–298. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3032-z>
- Wu H, D'Alessio AC, Ito S et al (2011) Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* 473:389–393. <https://doi.org/10.1038/nature09934>
- Zhang W, Xia W, Wang Q et al (2016) Isoform switch of TET1 regulates DNA demethylation and mouse development. *Mol Cell* 64:1062–1073. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.030>
- Zhong J, Li X, Cai W et al (2017) TET1 modulates H4K16 acetylation by controlling auto-acetylation of hMOF to affect gene regulation and DNA repair function. *Nucleic Acids Res* 45:672–684. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw919>

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

Titre : Caractérisation de la dynamique de l'ADN-glycosylase OGG1 et de résidus responsables de son interaction avec l'ADN en cellules vivantes

Mots clés : Réparation de l'ADN, 8-oxoguanine, OGG1, Dynamique, Microscopie Confocale

Résumé : L'ADN est constamment soumis à de nombreux stress, menaçant son intégrité et, par conséquent, le bon fonctionnement cellulaire. Pour y faire face, la cellule dispose de tout un arsenal de voies de réparation. L'une des altérations du génome les plus fréquentes est l'oxydation de la guanine en 8-oxoguanine (8-oxoG). La 8-oxoG possède un fort potentiel mutagène du fait de son appariement préférentiel avec l'adénine au lieu de la cytosine lors de la réplication. Ainsi, elle doit être détectée et réparée à temps pour éviter la fixation dans le génome de mutation par transversion G:C vers T:A. Cette lésion appairée à une cytosine est détectée et excisée par la 8-oxoguanine ADN-glycosylase (OGG1), ce qui initie la réparation par excision de base. Si le fonctionnement d'OGG1 a été largement étudié *in vitro* et que de nombreuses données structurales sont disponibles, très peu d'études se sont penchées sur la dynamique de cette protéine

au sein du noyau cellulaire. Le but de ma thèse était donc de caractériser la dynamique de recherche de la 8-oxoG par OGG1 et d'identifier les éléments (résidus ou fonctions) régulant cette dynamique. Ainsi, j'ai pu montrer que l'interaction avec l'ADN était un élément majeur de la recherche de la 8-oxoG par OGG1, et que muter les résidus impliqués dans l'interaction avec l'ADN perturbait la dynamique d'OGG1 et sa capacité à trouver et exciser la 8-oxoG. De même, la reconnaissance de la 8-oxoG, mais également celle de la cytosine lui faisant face, jouent toutes deux un rôle important dans le fonctionnement de l'ADN-glycosylase et son recrutement à la zone de dommages. Enfin, le motif NNN, très conservé mais très peu caractérisé jusqu'ici semble être essentiel à l'association spécifique avec la 8-oxoG mais pas à la dynamique de recherche.

Title : Characterization of the dynamics of the DNA-glycosylase OGG1 and of residues responsible for its interaction with DNA in living cells

Keywords : DNA repair, 8-oxoguanine, OGG1, Dynamics, Confocal Microscopy

Abstract : DNA is constantly subjected to various stress, threatening its integrity, and consequently, the proper functioning of the cell. In order to preserve the genomic integrity, the cell can activate a large set of repair pathways. One of the most common genomic alteration is the base modification 8-oxoguanine (8-oxoG), an oxidized form of guanine. It is highly mutagenic, due to its tendency to pair with adenine instead of cytosine during replication. Thus, it needs to be detected and repaired on time to avoid G:C to T:A transversions. 8-oxoG paired with cytosine is recognized and excised by the 8-oxoguanine DNA-glycosylase (OGG1), which initiates the base excision repair pathway. Although OGG1 has been widely studied *in vitro* and many structural data are available, many questions remain concerning the dynamics of the protein within the cell nucleus. Hence, the goal of my PhD project was to characterize the dynamics of OGG1 searching for 8-oxoG and get new insights about the residues or functions of OGG1 that regulate these dynamics.

I was able to show that the interaction between OGG1 and DNA is crucial for the efficient search of 8-oxoG, and that mutating the residues involved in such interaction impairs OGG1 dynamics and its ability to detect and excise 8-oxoG. Similarly, 8-oxoG detection, but also that of the facing cytosine, both play an important role in the function of the DNA-glycosylase and in its ability to accumulate at the sites of damage. Finally, the NNN motif, which is highly conserved but very poorly characterized, seems to be essential to the specific association with 8-oxoG, but not for the nuclear exploration by OGG1.