

Réparation de l'ADN

Comment trouver le bon partenaire ?

Judith Miné-Hattab, Rodney Rothstein



Department of genetics and development,
Columbia University Medical Center, 701 West 168th street,
Hammer Bldg, Room 1608, 10032 New York, NY, États-Unis.
judith.hattab.mine@gmail.com

► Tout au long de la vie d'une cellule, son ADN est la cible d'une grande variété d'agents capables de l'endommager. Parmi les différents types de cassures de l'ADN, les cassures double-brin sont les plus génotoxiques : une seule cassure incorrectement réparée est mutagène ou létale pour la cellule. La réparation de l'ADN est donc un processus essentiel permettant de préserver l'intégrité de notre génome [1]. Chez les eucaryotes, il existe deux mécanismes de réparation des cassures double-brin : la recombinaison non homologue et la recombinaison homologue. Cette dernière utilise une séquence d'ADN homologue intacte comme modèle afin de réparer la séquence endommagée. La séquence intacte peut être située sur la chromatide sœur : on parle alors de recombinaison intra-homologue. Cependant, des séquences homologues plus éloignées, présentes sur le chromosome homologue ou sur un autre chromosome, peuvent également servir de modèle ; on parle alors respectivement de recombinaison inter-homologue ou ectopique. Le processus de recherche d'homologie est étonnamment efficace sachant à quel point notre génome est compacté à l'intérieur du noyau [2, 3].

Les chromosomes explorent leur environnement

Grâce à l'évolution récente des techniques de microscopie et d'analyse d'images,

Photo : cellule de levure *Saccharomyces cerevisiae* contenant environ 20 cassures double brin induites par irradiation gamma ; les traces jaunes et rouges indiquent les trajectoires de deux chromosomes homologues. L'image finale est une mosaïque réalisée à partir des différentes images du film réalisé sur la cellule (© Judith Miné-Hattab).

il est possible de suivre en temps réel le mouvement d'une région d'ADN spécifique, appelée locus, à l'intérieur du noyau de cellules vivantes. À partir de la position de ce locus en fonction du temps, on peut déterminer l'espace que ce dernier peut explorer au sein du noyau en calculant son déplacement carré moyen¹ en fonction de l'intervalle de temps. Dans le cas d'un mouvement confiné, le déplacement carré moyen atteint un plateau proportionnel au volume de confinement du locus. En effet, pour de grands intervalles de temps, la distance moyenne parcourue par le locus devient indépendante de l'intervalle de temps écoulé, car le locus observé ne peut sortir d'un certain volume de confinement. Des études pionnières ont ainsi montré que les chromosomes de la levure ont un mouvement confiné ne leur permettant d'explorer qu'un petit volume du noyau [4, 5]. De récentes études suggèrent indirectement un changement de mobilité de l'ADN qui a subi une lésion [6-12], mais le mécanisme permettant à cet ADN endommagé de trouver son

¹ Dans le cas d'un mouvement brownien à une dimension (ligne droite), le déplacement d'une particule peut se faire soit en « pas » en avant, soit en « pas » en arrière. De plus, il est impossible de prédire cette direction, l'une (avant) et l'autre (arrière) étant équiprobables. Si l'on essaye de calculer la distance parcourue par cette particule en additionnant un à un les déplacements effectués à chaque pas (en prenant en compte que le déplacement à chaque « pas » arrière est soustrait de la distance totale parcourue), on arrive à la conclusion que la distance probable parcourue par cette particule est proche de zéro. Cependant, si au lieu d'additionner les déplacements, on additionne les carrés de ces déplacements, alors on ajoute une quantité positive à la distance totale qui croît donc à chaque pas. Ceci permet donc d'obtenir une meilleure évaluation de l'espace exploré par la particule. Le déplacement carré moyen est défini par une relation mathématique établie par Louis Bachelier en 1900. Suivant la forme de la courbe de déplacement carré moyen, on peut ensuite déterminer si le mouvement de la particule observée est directif, brownien ou brownien confiné (d'après la thèse de Sébastien Le Roux, 2008).

partenaire afin de restaurer sa séquence reste énigmatique.

Dans un article récemment publié dans *Nature Cell Biology*, nous avons suivi le mouvement de deux chromosomes homologues en l'absence et en présence de cassures double-brin dans des cellules diploïdes de levure *Saccharomyces cerevisiae* [13]. Nous avons ainsi observé une augmentation importante de la dynamique des chromosomes après induction d'une cassure double-brin, leur permettant ainsi d'explorer un volume nucléaire jusqu'à dix fois supérieur à ce qu'il est en l'absence de dommage. En conséquence, l'appariement entre chromosomes homologues est dix fois plus fréquent après induction d'une cassure double-brin. Cette mobilité accrue des chromosomes requiert les protéines de recombinaison homologue Rad51 et Sae2 et contribue à faciliter le processus de recherche d'homologie. Il est intéressant de noter que la mobilité des chromosomes non endommagés est également affectée dans ces conditions et augmente avec le nombre de cassures double-brin.

L'hypermobilité des chromosomes facilite l'appariement des chromosomes homologues

Pour observer la mobilité des chromosomes homologues *in vivo*, nous avons développé des souches de levures diploïdes dans lesquelles deux locus homologues ont été marqués par des molécules fluorescentes grâce à l'introduction des opérateurs tetO et lacO et de leurs partenaires de liaison fluorescents TetR-RFP (rouge) et LacI-YFP (jaune)

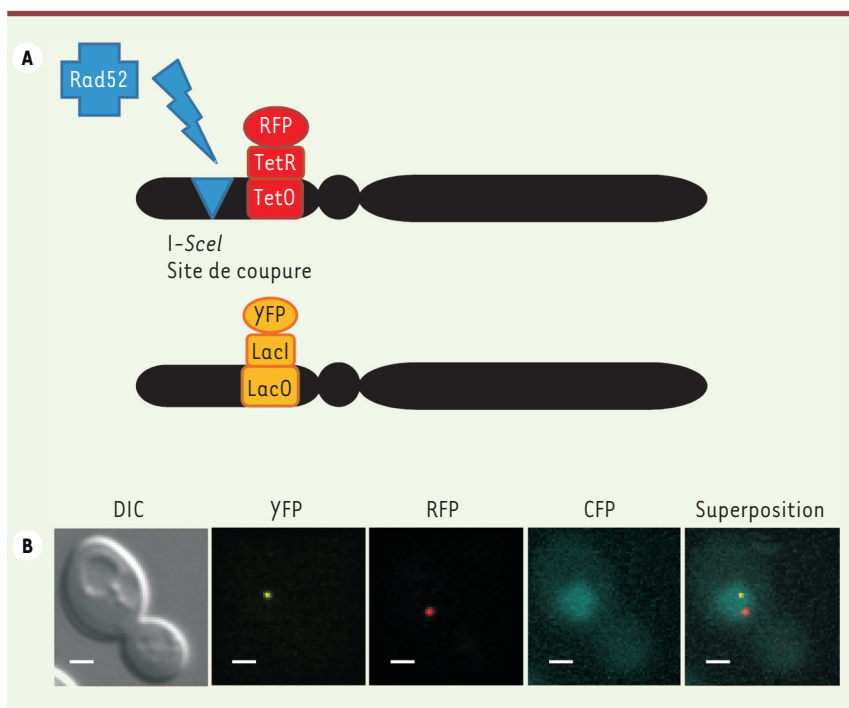


Figure 1. Description des souches utilisées pour étudier la dynamique des chromosomes. **A.** Des séquences tetO et lacO ont été introduites dans le gène *URA3* des chromosomes homologues V, ainsi que leurs partenaires de liaisons TetR et Lacl fusionnés avec des marqueurs fluorescents rouge et jaune (RFP et YFP, respectivement). Le locus marqué en RFP contient un site unique I-SceI permettant de créer une cassure double-brin à proximité de l'opérateur tetO. La protéine Rad52, marquée en bleu par la CFP, forme un foyer colocalisant avec la cassure et sert ainsi de marqueur de la présence de cassures double-brin. **B.** Images en DIC (*differential interference contrast microscopy*), YFP, RFP et CFP des souches utilisées. Les foyers YFP et RFP identifient les deux locus homologues dans la cellule (visualisée en contraste de phase à gauche). Sur ces images, aucune cassure double-brin n'a été induite et on ne détecte aucun foyer CFP colocalisé sur un chromosome (la protéine Rad52 n'est pas concentrée sur le site de cassure, le marquage est diffus). Dans ces conditions, les chromosomes homologues restent éloignés et parfaitement individualisables. La barre d'échelle représente 1 μ m. Les photographies sont extraites de [13] (avec la permission de © Nature Publishing group).

(Figure 1A). Ces locus ainsi marqués sont visualisés par microscopie à champ large (Figure 1B). De plus, un site de coupure unique I-SceI a été placé à proximité du locus marqué par le RFP, permettant d'induire de manière contrôlée une cassure double-brin unique dans le génome. La protéine Rad52 fusionnée au fluorophore bleu CFP a été utilisée comme marqueur de la présence d'une cassure double-brin. Ce système nous a permis de mesurer la distance entre locus homologues ainsi que le mouvement de ces locus en l'absence, puis en présence, d'une cassure double-brin. En l'absence de cassure, les chromosomes

homologues sont éloignés et n'explorent que 3 % du volume nucléaire (Figure 2A). Leur probabilité d'appariement spontané est alors extrêmement faible. Au contraire, 2 h après induction d'une cassure double-brin, la fréquence d'appariement des locus homologues est environ 10 fois supérieure et leur dynamique augmente de telle sorte que leurs volumes de confinement se recouvrent. Le chromosome endommagé est le plus affecté, et explore un volume dix fois plus grand que celui qu'explore un chromosome non lésé. De façon inattendue, le partenaire homologue dont la séquence est restée intacte, ainsi que

les chromosomes non homologues, sont également plus mobiles et explorent un volume quatre fois plus grand qu'en l'absence de dommage (Figure 2B). Le volume exploré par les chromosomes augmente avec le nombre de cassures dans la cellule (Figure 2C). La recherche d'homologie ne semble pas être un processus de recherche dirigé vers une cible, mais plutôt une modification non orientée de la mobilité des chromosomes, en particulier du chromosome endommagé. Ceci leur permet d'explorer un volume plus large du noyau, augmentant ainsi la fréquence de collisions entre des chromosomes normalement éloignés en l'absence de dommage. Le coefficient de diffusion, qui reflète la vitesse moyenne à laquelle se déplacent les chromosomes, reste cependant inchangé en présence de cassures. Ceci pourrait s'expliquer par un changement général de l'état de la chromatine en réponse à une cassure double-brin dans le génome qui, pour autant, ne modifie pas la dynamique locale de l'ADN.

Les protéines de recombinaison homologue contrôlent l'hypermobilité des chromosomes

Nous avons ensuite montré que l'appariement des chromosomes homologues et leur hypermobilité sont dépendants des protéines de recombinaison homologue [13]. En effet, l'absence de la protéine Sae2, impliquée dans la dégradation de la séquence endommagée en ADN simple brin, retarde l'appariement des locus homologues ainsi que leur hypermobilité. De plus, l'absence de la protéine Rad51, l'une des protéines essentielles de la recombinaison, inhibe l'appariement et l'hypermobilité des chromosomes en présence de cassures. Ceci confirme également que l'hypermobilité des chromosomes est corrélée à la recherche d'homologie et l'appariement des chromosomes homologues. Le rôle des microtubules, des filaments d'actine ou des topoisomères sur la mobilité des chromosomes n'a pas encore été élucidé. Une étude

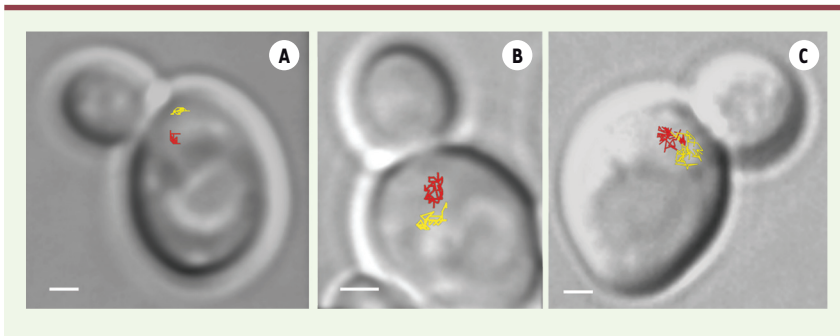


Figure 2. Exemples de la dynamique typique des locus *URA3* (chromosome V) en fonction du nombre de cassures double-brin dans une cellule. A. En l'absence de cassure, les deux locus homologues sont éloignés et n'explorent que 3 % du volume nucléaire. **B.** En présence d'une à quatre cassures par noyau sur un chromosome non homologue (chromosome III dans ce cas), la mobilité des locus *URA3* augmente de telle sorte que chaque locus *URA3* explore 11 % du volume nucléaire. **C.** En présence d'environ 20 cassures par noyau, induites par irradiation γ (200 Gy), les locus *URA3* explorent la quasi-totalité du volume nucléaire et leurs trajectoires se recouvrent. Ainsi, lorsque le nombre de cassures double-brin augmente, la mobilité et la probabilité de collision entre les deux locus marqués augmentent. La barre d'échelle représente 1 μ m. Les lignes indiquent les trajectoires effectuées par chacun des locus pendant environ 15 minutes.

publiée par Dion *et al.*, simultanément à la nôtre, met également en évidence une augmentation de la mobilité des chromosomes cassés dans des cellules de levure haploïdes [14]. Dans cette condition haploïde, le chromosome endommagé n'a pas de partenaire homologue. Il effectuerait alors une recherche d'homologie pendant plusieurs heures avant d'être relocalisé en périphérie du noyau [8, 9, 11]. Dion *et al.* ont montré que la mobilité des chromosomes en présence de ces cassures irréparables est dépendante des protéines Rad51, Mec1 (analogue de ATR, *ataxia telangiectasia Rad3-related protein*), de la fonction ATPase de Rad54 et de la protéine Rad9 (partageant des similitudes avec Brc1, *breast cancer 1*) [14]. De manière intéressante, la présence de cassures simple-brin ne modifie pas la mobilité des chromosomes [14].

Recherches futures : dynamique de l'ADN et intégrité du génome

L'hypermobilité des chromosomes en présence de cassures double-brin semble être un processus conservé parmi les organismes [10, 12, 15], son amplitude étant probablement moindre dans les cellules humaines que dans celles de levure. L'augmentation de la mobilité des chromosomes pouvant favoriser des événements de recombinaison ectopique et être source de translocations pathologiques, l'étude des mécanismes régulant cette hypermobilité nous permettra de mieux comprendre comment nos cellules maintiennent l'intégrité de leur génome. ♦

DNA repair: finding the perfect match

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par une bourse EMBO long-term fellowship (J.M.H.), une bourse Marie Curie International Outgoing Fellowship (J.M.H.), la Fondation Bettencourt-Schueller (J.M.H.), une bourse de la Fondation Philippe (J.M.H.), et une bourse du National Institutes of Health (NIH) (GM67055, R.R.).

RÉFÉRENCES

1. Agarwal S, Tafel AA, Kanaar R. DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA Repair (Amst)* 2006 ; 5 : 1075-81.
2. Misteli T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 2007 ; 128 : 787-800.
3. Barzel A, Kupiec M. Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination? *Nat Rev Genet* 2008 ; 9 : 27-37.
4. Marshall WF, Straight A, Marko JF, *et al.* Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. *Curr Biol* 1997 ; 7 : 930-9.
5. Heun P, Laroche T, Shimada K, *et al.* Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science* 2001 ; 294 : 2181-6.
6. Lisby M, Mortensen UH, Rothstein R. Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol* 2003 ; 5 : 572-7.
7. Aten JA, Stap J, Krawczyk PM, *et al.* Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 2004 ; 303 : 92-5.
8. Nagai S, Dubrana K, Tsai-Pflugfelder M, *et al.* Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase. *Science* 2008 ; 322 : 597-602.
9. Kalocsay M, Hiller NJ, Jentsch S. Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Mol Cell* 2009 ; 33 : 335-43.
10. Dimitrova N, Chen YC, Spector DL, de Lange T. 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* 2008 ; 456 : 524-8.
11. Oza P, Jaspersen SL, Miele A, *et al.* Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes Dev* 2009 ; 23 : 912-27.
12. Chiolo I, Minoda A, Colmenares SU, *et al.* Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* 2011 ; 144 : 732-44.
13. Miné-Hattab J, Rothstein R. Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nat Cell Biol* 2012 ; 14 : 510-7.
14. Dion V, Kalck V, Horigome C, *et al.* Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nat Cell Biol* 2012 ; 14 : 502-9.
15. Krawczyk PM, Borovski T, Stap J, *et al.* Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Sci* 2012 ; 125 : 2127-33.



Tarifs d'abonnement m/s - 2012

**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

**Bulletin d'abonnement
page 790 dans ce numéro de m/s**

