La maintenance de l’intégrité du génome est essentielle pour la vie de la cellule et tout disfonctionnement peut mener à de graves pathologies comme des cancers ou des maladies rares. Les patients atteints de xeroderma pigmentosum (XP) présentent un risque accru de cancer de la peau du fait d’une hypersensibilité à la lumière, notamment Ultra-Violette. Les patients atteints du syndrome de Cockayne ont des défauts sévères du développement. Ces deux maladies rares sont causées par des mutations dans les gènes de la Réparation par Excision de Nucléotides (NER). Le NER est une voie de réparation de l’ADN qui retire les lésions volumineuses de la double hélice, comme ceux induits par les UV ou les médicaments anticancéreux à base de cisplatine. Le NER détecte les lésions par deux sous voies différentes, une seule est liée à la transcription mais les deux déclenchent la même cascade enzymatique d’excision. Notre laboratoire cherche à comprendre les mécanismes fondamentaux du NER. Pour cela nous utilisons des techniques de génétique, génomique fonctionnelle et bioinformatique chez la levure et dans les cellules humaines.

Ce projet fait partie d’une collaboration entre plusieurs équipes combinant les approches de génomique fonctionnelle, de chimie analytique, biochimie et bioinformatique pour comprendre la dynamique du processus de réparation d’ADN. L’objectif du stage est de décrire précisément la vitesse et la contribution de chaque sous voie du NER chez la levure. Pour cela, l’étudiant(e) apprendra et mettra en œuvre les cultures de levures, l’irradiation UV afin d’induire les dommages dans l’ADN, et l’échantillonnage pour suivre la réparation au cours du temps. L’étudiant(e) procédera à l’extraction de l’ADN génomique, qui sera envoyé aux collaborateurs pour une quantification absolue des dommages. Il/elle procédera aussi à l’extraction de la chromatine et aux techniques de génomiques fonctionnelles (Immuno-Précipitation de chromatine (ChIP) et d’ADN (DIP), couplé au séquençage Illumina) permettant de localiser et quantifier les dommage et les protéines de réparation sur le génome. Les expériences seront faites dans des souches de levures inactivées pour différents facteurs du NER, ce qui permettra d’estimer la contribution en temps et sur le génome de chaque sous voie. Les résultats attendus contribueront à la compréhension du NER à l’échelle du génome et permettront de répondre à des questions fondamentales concernant les maladies associées.

Dates du stage: Premier semestre 2024

Contact: Cyril DENBY WILKES: cyril.denby-wilkes@i2bc.paris-saclay.fr

Equipe : Genome Transcriptional Regulation (Julie SOUTOURINA)

Website : <https://www.i2bc.paris-saclay.fr/equipe-genome-transcriptional-regulation/>

Lieu du stage: CEA Saclay, RD36, Bât144, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex

Mots clés : Réparation d’ADN par Excision de Nucléotides, génomique fonctionnelle.

Méthodologie: Immuno-Précipitation de chromatine (ChIP) et d’ADN (DIP), extraction d’ADN et réparation, PCR quantitative ; préparation de banque pour séquençage Illumina; Analyses bioinformatiques

The maintenance of genome integrity is essential for cells and its disfunction leads to severe pathologies including cancers or rare diseases. Thus, patients with xeroderma pigmentosum (XP) disease present an increased risk of skin cancer due to high photosentivity. Patients with Cockayne Syndrome (CS) are characterized by severe symptoms including progressive developmental defects. Both diseases are caused by mutations in the genes of Nucleotide Excision Repair (NER). NER is a DNA repair pathway that removes bulky lesions, such as those induced by Ultra-Violet light (UV), or cisplatin-based chemotherapeutic drugs. NER detects DNA damage with two different subpathways, one of which is coupled to transcription, both leading to the same excision cascade. Our laboratory is interested in understanding of the fundamental mechanisms of the NER. We use genetic, functional genomic and bioinformatic approaches in budding yeast and human cell lines.

This project is a part of a collaborative program combining functional genomics, analytical chemistry, biochemistry and bioinformatics to understand the dynamics of DNA repair process. This internship aims at describing precisely the repair kinetics and the contribution of both NER subpathways in the budding yeast. The student will treat the yeast culture with UV to induce DNA damage and sample cells over time to study repair kinetics. Genomic DNA will be isolated and send to collaborators for DNA damage absolute quantification, whereas the chromatin will be processed in our laboratory. With functional genomics methods (such as DNA/Chromatin Immuno-Precipitation coupled to quantitative PCR or illumina sequencing) we will probe for DNA damage and protein localisation on the genome. Experiments will be performed in yeast strains inactivated for different NER components allowing us to estimate the contribution over time and space of both NER subpathways. The expected results will contribute to study DNA repair on a genomic scale addressing fundamental biological questions relevant for diseases.

Date: first semester 2024

Contact: Cyril DENBY WILKES: cyril.denby-wilkes@i2bc.paris-saclay.fr

Team: Genome Transcriptional Regulation (Julie SOUTOURINA)

Website: <https://www.i2bc.paris-saclay.fr/equipe-genome-transcriptional-regulation/>

Internship location: CEA Saclay, RD36, Bât144, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex

Key words: DNA repair, functional genomics, Nucleotide Excision Repair

Methodology: DNA/Chromatin Immunoprecipitation, DNA extraction & repair, quantitative PCR ; Illumina library preparation ; NGS bioinformatic analyses

### References from the laboratory:

Eyboulet, F., Cibot, C., Eychenne, T., Neil, H., Alibert, O., Werner, M., Soutourina, J., 2013. Mediator links transcription and DNA repair by facilitating Rad2/XPG recruitment. Genes Dev. 27, 2549–2562. <https://doi.org/10.1101/gad.225813.113>

Georges, A., Gopaul, D., Denby Wilkes, C., Aiach, N.G., Novikova, E., Barrault, M.-B., Alibert, O., Soutourina, J., 2019. Functional interplay between Mediator and RNA polymerase II in Rad2/XPG loading to the chromatin. Nucleic Acids Research 47, 8988–9004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz598>

Gopaul, D., Denby Wilkes, C., Goldar, A., Aiach, N.G., Barrault, M.-B., Novikova, E., Soutourina, J., 2022. Genomic analysis of Rad26 and Rad1–Rad10 reveals differences in their dependence on Mediator and RNA polymerase II. Genome Research 32, 1516–1528. <https://doi.org/10.1101/gr.276371.121>

Zeitler, L., Denby Wilkes, C., Goldar, A., Soutourina, J., 2022. A quantitative modelling approach for DNA repair on a population scale. PLoS Comput Biol 18, e1010488. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010488>

### References from the literature

Duan, M., Selvam, K., Wyrick, J.J., Mao, P., 2020. Genome-wide role of Rad26 in promoting transcription-coupled nucleotide excision repair in yeast chromatin. Proc Natl Acad Sci U S A 117, 18608–18616. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003868117>

Hu, J., Li, W., Adebali, O., Yang, Y., Oztas, O., Selby, C.P., Sancar, A., 2019. Genome-wide mapping of nucleotide excision repair with XR-seq. Nat Protoc 14, 248–282. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0093-7>

Mao, P., Smerdon, M.J., Roberts, S.A., Wyrick, J.J., 2016. Chromosomal landscape of UV damage formation and repair at single-nucleotide resolution. PNAS 113, 9057–9062. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606667113>

Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H.J., 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. Nature Reviews Molecular Cell Biology 15, 465. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>