

# Etude structurale et fonctionnelle de complexes multi-protéiques impliqués dans la voie NHEJ humaine Karima Benferhat

## ▶ To cite this version:

Karima Benferhat. Etude structurale et fonctionnelle de complexes multi-protéiques impliqués dans la voie NHEJ humaine. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT: 2018SACLS271. tel-03245693

# HAL Id: tel-03245693 https://theses.hal.science/tel-03245693

Submitted on 2 Jun 2021

**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.

# UNIVERSITE PARIS-SACLAY



Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay Préparée à l'université paris sud

École doctorale n°582 Cancérologie : biologie - médecine – santé (CBMS) Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 27 septembre 2018 par

# KARIMA BENFERHAT

Rapporteur

Examinatrice

Composition du Jury :

Dr. Sophie CHERUEL Présidente Directrice de recherche CNRS, I2BC, UMR9198 CNRS Gif Sur Yvette

Dr. Gilles MIRAMBEAU Maitre de conférences, Sorbonne Université, Paris

Dr. Emmanuelle MARTINI Examinatrice Chargée de recherche CEA, UMR967 INSERM, CEA Fontenay aux roses

Dr. François LECOINTE Examinateur Chargé de recherche INRA, Institut MICALIS, UMR 1319 INRA Jouy En Josas

Dr. Sonia BACONNAIS Ingénieure de recherche CNRS, UMR8126, Gustave Roussy

Dr Jean Baptiste CHARBONNIER Co-Directeur de thèse Directeur de recherche CEA, I2BC, UMR9198 CNRS, Gif Sur Yvette

Dr. Eric LE CAM Directeur de thèse Directeur de recherche, CNRS, UMR8126 CNRS Gustave Roussy

# Remerciements

J'adresse ma sincère reconnaissance aux membres de jury pour avoir accepté de consacrer du temps à l'examen de ce travail. Je remercie Madame Sophie Cheruel d'avoir accepter d'être rapporteur de ma thèse et de présider le jury. Je remercie Monsieur Gilles Mirambeau d'avoir accepter d'être rapporteur de ma thèse. Merci à Madame Emmanuelle Martini, à Monsieur François Lecointe d'avoir accepter d'être examinateurs.

Je tiens à remercier chaleureusement en premiers lieu mon directeur de thèse Monsieur Eric Le CAM, qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a encadré tout au long de cette thèse. Je le remercie pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodiguée. Je suis ravie d'avoir travaillé avec lui car outre son appui scientifique, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller. Je le remercie aussi pour les nombreuses discussions passionnantes qui m'ont permis de maturer ma reflexion sur le sujet.

Je remercie Dr. Joëlle Wiels, Directrice de l'UMR8126 pour m'avoir accueillie au sein de son unité et de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie Monsieur Jean Baptiste Charbonnier (I2BC, Gif sur Yvette) d'avoir accepté d'être mon co-directeur de thèse.

Je remercie particulièrement Madame Sonia Baconnais, qui a également encadré ce travail de recherche. Son écoute, ses connaissances sur le sujet, nos échanges au quotidien et ses conseils constructifs m'ont guidé tout au long de cette thèse. Je la remercie aussi pour la lecture méticuleuse de chacun des chapitres de cette thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe "Maintenance du Génome et Microscopie moléculaire" de l'UMR 8126 pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun m'ont beaucoup apporté. Merci donc à Alexandra Joubert et Catherine Durieu pour leurs conseils, leur présence et nos dicussions et je vous souhaite bon courage dans vos nouvelles aventures scientifiques. Merci à Jeanne Ayache pour son enthousiasme et son rire communicatif et merci pour la relecture enrichissante du chapitre sur la microscopie électronique. Merci à Olivier Piètrement pour nos échanges surtout pour ton aide et ta disponibilité, et pour mon initiation à la microscopie à force atomique. Merci à Pauline Dupaigne pour nos échanges scientifiques, tes conseils humains et ton soutien moral dans les moments de doute. Merci à Yann Benureau pour nos échanges, ta bonne humeur et tes conseils avisés. Merci à Eliana Tavares pour ton amitié, tes encouragements et ton enthousiasme.

Je souhaite remercie aussi nos collaborateurs. Merci à E. Egelman avec qui on a collaboré pour obtenir la structure 3D du filament XRCC4. Merci à Gérard Péhau-Amaudet de l'Institut Pasteur qui participe à la caractrésation des filaments en cryo-MET.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et à mes amis qui, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu la soutiens cette thèse? », bien qu'angoissante m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Je remercie particulièrement mes parents, ma mére pour son soutien, son education et sa présence, mon regretté père,"paix à son âme", pour tous ce qu'il m'a appris, sa confiance et ses conseils qui m'accompagneront toute ma vie. Je remercie ma grand-mère Nouara, mes soeurs Lydia et Nouara ainsi que mon frère Ighil pour leur soutient moral, leurs encouragements et leur présence. Je remercie ma tante Zohra et son mari Djamal. Merci à ma tante Nadia et son mari Ali ainsi que mes cousins Yacine, Amina et Yuba. Je remercie mon oncle Rachid pour sa gentilesse et son soutien. Merci à mes cousins Omar, Ilyes et Merzak. Je remercie Haciane Doria pour son amitié et son soutien.

# Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	5
Table des illustrations	9
Liste des tableaux	11
Abbréviations	13
A- Introduction	15
I- Les cassures double brins	17
I-1- L'origine des CDBs	17
I-2- L'hétérogénéité des CDBs	18
II- La réparation des Cassures Double Brins de l'ADN	19
II-1- La réparation par recombinaison homologue	19
II-2- La réparation par lonction des extrémités	22
a- La voie NHEL Classique	22
a1- Mécanisme du NHEL classique chez les bactéries.	
a2- La voie NHEJ classique chez les eucarvotes	26
b- La voie du Alternative-End Joining	28
III- Les protéines impliquées dans la voie NHEJ chez les mammifères	31
III-1-L'hétérodimère Ku70/Ku80	31
a- Les fonctions de l'hétérodimère Ku70/Ku80	31
a1- Ku dans le NHEJ	31
a2- La protection des télomères par l'hétérodimère Ku70/Ku80	34
a3- Ku70/Ku80 dans la transcription	34
b- La structure de l'hétérodimère Ku70/Ku80	35
III-2- DNA-PKcs (DNA-Protein kinase catalytic subunit)	36
a- La fonction de DNA-PKcs	37
b- La structure de DNA-PKcs	38
III-3- Les protéines impliquées dans la maturation des extrémités	39
a- Les nucléases	40
a1- La nucléase Artémis	40
a2- La nucléase APLF (Aprataxin and PNK-like factor)	40
a3- L'hélicase nucléase WRN (Werner)	41
b- La PNK (PolyNucleotide Kinase)	41
c- Les ADN polymérases: TdT, pol $\mu$ , pol $\lambda$ et pol $eta$	41
III-4- Les partenaires du complexe de ligation	42
a- Ligase IV	42
a1- La fonction de Ligase IV	43
a2- La structure de la Ligase IV	43
b- XRCC4 (X-Ray-sensitive Cross-Complementing group 4)	44
b1- Les fonctions de XRCC4	44
b2- La structure de XRCC4	46
C- LE COMPIEXE XRCC4-Ligase IV	47
d1-La fonction de XLE	40 ∕1 Ω
d2- La structure de XLF	0+ 40
e- Le complexe XRCC4/XLF	
IV- La microscopie	
IV-1- Le principe de la microscopie électropique	52
IV-2- La microsconie électronique à transmission (MFT)	5/
a-1'observation en fond clair	

b- L'observation en fond noir	
IV-3- Les techniques de préparation des échantillons	58
a- La coloration négative	
b- La coloration positive	
IV-4- Cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-MET)	60
a- Les principes de la Cryo-microscopie électronique à transmission	60
b- La préparation des grilles utilisées en Cryo-TEM	61
c- La Cryo-fixation	
d- Le cryo-transfert	63
e- L'observation en mode low dose	64
f- Avantages et inconvénients de la Cryo-MET	64
IV-5- Microscopie à force atomique	65
V- Axes de recherche du laboratoire et objectifs de la thèse	69
P. Matárials at máthadas	70
D- Materies et methodes	
I- Expression des proteines recombinantes	
II- Caracterisation des complexes proteiques	71
II-1- Analyses par microscopie électronique à transmission	71
a- Coloration négative et observation en fond clair	71
a1- Préparation des grilles	71
a2- Effluvage des grilles	72
a3- Préparation des échantillons	72
a4- Coloration négative et observation en fond clair	
b- Coloration positive et observation en fond noir	
b1- Préparation du carbone	
b2- Préparation des grilles	
b3- Ionisation des grilles	
b4- Preparation des echantillons	
b5- Coloration positive et observation en fond noir	
c- Marquage aux billes d'or	
II-2- Analyses biochimiques et biophysiques	76
a- Chromatographie d'exclusion stérique	
b- Electrophorèse en conditions dénaturantes	
c- Electrophorèse dans des conditions non dénaturantes (Natives)	
d- Titration Calorimétrique Isotherme (ITC)	
II-3- La structure du filament XRCC4 <sub>FL</sub>	81
a- Introduction et principe de la méthode	
b- Caractérisation de la chiralité du filament XRCC4	
b1- Détermination de la chiralité en MET par ombrage métallique	
b2- Determination de la chiralite par microscopie à force atomique (AFM)	
c- La caracterisation en Cryo-EM des filaments	
c1- Effluvage par plasma des grilles	
c2- La Cryo-fixation (vitrification de l'echantilion)	
c3- Cryo-transfert de l'échantilion	
C4- L'Observation en mode Low dose	
III- Formation et études des complexes nucleoproteiques	
III-1- Synthese et purification des substrats d'ADN	8/
a- PCR (Polymerase Chain Reaction)	
b- Analyse d'ADN en electrophorese sur gel d'agarose	
C- Purification des tragments d'ADN	
a- Precipitation et quantification d'ADN	
III-2- Caracterisation des interactions ADN protéines	90
a- Retard sur gel (EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay)	
1a- principe de la méthode	
a2- Etude de l'interaction entre XRCC4, XLF et l'ADN	
a3- Etude de l'interaction entre l'hétérodimère Ku70/Ku80 et l'ADN	

b- Microscopie électronique à transmission (coloration positive)	92
b1- Protocole de la coloration positive	92
b2- Etude de l'interaction de XRCC4 avec l'ADN	92
b3- Etude de l'interaction de XLF avec l'ADN	93
b4- Etude de l'interaction du complexe XRCC4-Ligase IV avec l'ADN	93
b5- Etude de l'interaction de l'hétérodimère Ku70/Ku80 avec l'ADN	93
b6- Etude de l'interaction du complexe ADN-Ku avec XLF et XRCC4	93
c- Microscopie à force atomique	95
C- Résultats et discussions	95
I- Caractérisation de XBCC4 et XI F	95
I-1- Bannel des résultats obtenus avec les formes tronquées	95
L2. Los formos antiàros do VPCCA at VIE	101
-2- Les Torries entières de ANCC4 et ALT	102
a- ARCC4 <sub>FL</sub> et ALF <sub>FL</sub> existent sous forme à origomeres en solution	102
al- Ger a electrophorese flatif	102
b XPCC4 coul on abconce do XLE forme dos filaments	102
b1- Mise en évidence d'un assemblage de XPCC4 - en filaments nar MET	105
b1- Mise en evidence d'un assemblage de XRCC4 <sub>FL</sub> en mainents par MET	107
c. VIE – ne forme nas de filaments	102
c1 <sub>-</sub> Caractárisation de VIE - en MET	100
d- XRCC1-, et XI E-, forment des filaments	100
d1- Caractérisation du complexe XAEL-XLEEL en MET	109
d2- Marguage aux hilles d'or de XI FEL en MET	110
L 3- Structure des filaments XRCCA par Microscopie Électropique	111
2- Structure des filaments XRCC4 par Microscopie Lieutionique	111
h- Détermination de la chiralité par MET et par AEM	114
b Détermination de la chiralité en MET par ombrage métallique	114
b2- Détermination de la chiralité par AFM	114
c- Etablissement de la première reconstruction 3D du filament XRCC4	115
d- Structure des filaments XRCC4 par Crvo-TEM	116
I-4- Discussion	117
II- Pronriétés des filaments XRCC4.	121
$II_{-1}$ les paramètres physicochimiques modulant l'assemblage des filaments XPCCA	121
2- Effet de la concentration à différentes températures à 10 min d'incubation	121
$a^{-}$ Lifet de la concentration à différences temperatures à 10 min d'incubation	122
a1- A4 C	122
a2- A 25 C	123
h- Effet de la température à différentes concentrations à 10 min d'incubation	125
h1- A 5 nM	125
b2- A 50 nM	126
b3- A 250 nM	127
c- Effet de la concentration à différentes températures à 30 min d'incubation	128
c2- A 25°C	129
c3- A 37°C	130
d- Analyses statistiques	130
II-2- Les filaments XRCC4 <sub>FL</sub> forment des réseaux	134
II-3- Elongation des filaments XRCC4 <sub>FL</sub> en présence de XLF	137
II-4- Elongation des filaments XRCC4 <sub>FL</sub> en présence d'ADN	138
a-Polymérisation des filaments XRCC4 indépendante de la présence des extrémités libres d'ADN	138
b- L'ADN favorise l'élongation : stabilisation des complexes	139
c- L'ADN favorise la condensation des filaments	139
c1- L'ADN favorise la condensation des filaments XRCC4 <sub>FL</sub>	139
c2- L'ADN favorise la condensation des filaments XRCC4 <sub>FL</sub> - XLF	141
II- 5-Discussion	142

III- Interaction de XRCC4, XLF et du complexe XRCC4/Ligase IV avec l'ADN	144
III- 1- Caractérisation en gel retard de l'interaction de XRCC4 et de XLF avec l'ADN	144
III- 2- Caractérisation des complexes en MET	147
a- Les complexes XRCC4–ADN	147
b- Les complexes XLF-ADN	150
c- Les complexes Ligase IV-ADN	152
c1- Liaison à l'ADN en absence d'ATP et magnésium	152
c2- Liaison à l'ADN en présence d'ATP et magnésium	153
III- 3- Discussion	155
IV- Interaction du complexe de ligation avec le complexe de reconnaissance	159
IV-1- Assemblage de Ku70/Ku80 sur l'ADN	159
a- Caractérisation de l'interaction de Ku avec l'ADN par gel retard	159
b- Complexes ADN-Ku en TEM et AFM	166
b1- La fixation de Ku est coopérative	167
b2- Positionnement de Ku sur l'ADN en AFM	169
IV-2- Interaction du complexe ADN-Ku avec XLF et XRCC4	170
a- Préparation du complexe ADN-Ku bloqué sur l'ADN par la streptavidine	172
b- XLF bridge les complexes ADN-Ku en présence du domaine KBM	174
c- Les filaments XRCC4-XLF interagissent avec le complexe ADN-Ku	177
IV- 3- Discussion	178
D- Conclusions et Perspectives	181
E- Annexes	187
Annexe 1	
Annexe 2	
F- Bibliographie	189
G- Ouvrages	217

# Table des illustrations

Figure 1: Hétérogénéïté des CDBs	18
Figure 2 : La réparation par recombinaison homologue	21
Figure 3: Organisation en opérons contenant les gènes qui codent pour Ku et la ligase chez les bactéries	24
Figure 4: L'homodimère Ku	25
Figure 5: Organisation des multi domaines de LiaD	26
Figure 6: Modèle simple du NHEJ chez les mammifères	28
Figure C: Modèle simple de la voie Alternative End Joining chez les mammifères	30
Figure 8: Les domaines protéigues de l'hétérodimère Ku70/Ku80	35
Figure 9: Structure cristalloaranhique de l'hétérodimère Ku70/Ku80 humain	36
Figure 10 : Les domaines protétaues de DNA-PKcs	38
Figure 10: Structure de DNA-PKcs	30 39
Figure 12: Structure de la Liagse IV	
Figure 12: Structure de YPCCA	44 
Figure 13: Structure de XNCC4	40 
Figure 14. L'assemblage en lettamere de XRCC4.	4/
Figure 15. Structure de ALF	49 
Figure 10: Interaction des electrons avec les atomes des echantmons	53
Figure 17: Les signaux après interaction au jaisceau à electrons avec les atomes de l'echantilion	54
Figure 18: Schema au microscope electronique	56
Figure 19: Les modes d'observations en microscopie electronique à tranmission	58
Figure 20: Les differents états de la glace	61
Figure 21: Les grilles utilisées en Cryo-MET	61
Figure 22: Schéma d'un plongeur à déclenchement manuel	62
Figure 23: Préparation des échantillons en Cryo-TEM	63
Figure 24: Système de transfert d'échantillons	64
Figure 25: Les dommages observés dans les échantillons congelés après exposition à des doses croissantes	;
d'électrons	65
Figure 26: Schéma des composants d'un microscope à force atomique	66
Figure 27: Schéma de la cellule liquide de l'AFM	68
Figure 28: Schéma des étapes clés d'expression des protéines avec le système MultiBac	70
Figure 29: Principe de la séparation des macromolécules sur une colonne d'exclusion de taille	77
Figure 30: Diapositive calorimétrie	80
Figure 31: Le principe de la méthode IHRSR	82
Figure 32: Représentation schématique des paramètres d'une hélice	83
Figure 33: Structure cristallographique du complexe XRCC4 <sub>157</sub> –XLF <sub>224</sub>	97
Figure 34 : Images en MET (coloration négative) de XRCC4 <sub>157</sub> et XLF <sub>224</sub>	99
Figure 35: l'assemblage en filament de XRCC4 tronqué et XLF tronqué	100
Figure 36: Superposition des modèles d'assemblage en filaments XRCC4 tronqué et XLF tronqué	
Figure 37: XRCC4 <sub>FI</sub> et XLF <sub>FI</sub> existent sous forme d'oligomères	
Figure 38: Assemblage en filament de XRCC4 <sub>Fl</sub>	105
Figure 39: XRCC4 <sub>EI</sub> forme des reseaux de filaments	
Figure 40: Différence de comportement dans l'assemblage des filaments en fonction de la présence du doi	maine
C-Ter	107
Figure 41: XI E <sub>EP</sub> ne forme nas de filaments	108
Figure 42: Le complexe X4 <sub>51</sub> -XI E <sub>51</sub> s'assemble en filaments	109
Figure 42: XI F <sub>2</sub> , s'intègre dans le filoment XA <sub>2</sub> .	111
Figure 43: NEI FL'S integre dans le filament AFL	112
Figure 45: Modélisation de A filaments en narallèle	112 113
Figure 45: Modelisation de 4 jildments en paranele	113 112
Figure 40. Spectre de puissance moyen	۲۲۲ ۱۱۸
Figure 47. Determination de la chinante da juantent Anco4 par onibilage fotalij	<sup>114</sup> 115
Figure 40. Induge obtenues en Arivi, mode contact intermittant	112 11 <i>2</i>
rigure 43. ANGC4FL JUTTIE UII JIUTTIETI TETICOTUURE	110
rigure 50. Innuges Cryo-Teivi au Jiament XRCC4 et spectre de puissance	/
Figure 51: Sherna au processos de polymerisation et de depolymerisation	121
Figure 52: Distribution en pourcentage de la longueur des filaments XKCC4 <sub>FL</sub> incubes 10 min à 4 $^{\circ}$ C	122

Figure 53: Distribution en pourcentage de la longueur des filaments XRCC4 incubés 10 min à 25°C	123
Figure 54: Distribution en pourcentage de la longueur des filaments XRCC4 incubés 10 min à 37°C	124
Figure 55: Distribution en pourcentage de la longueur des filaments XRCC4 (5 nM de XRCC4 incubé 10 min)	125
Figure 56: Distribution en pourcentage de la longueur des filaments XRCC4 (XRCC4 à 50 nM incubé 10 mn)	126
Figure 57: Distribution en pourcentage de la longueur des filaments XRCC4 (XRCC4 à 250 nM incubé 10 min)	127
Figure 58: Distribution en pourcentage de la longeur des filaments XRCC4 incubés 30 min à 4°C	128
<i>Figure 59: Distribution en pourcentage de la longeur des filaments XRCC4 incubés 30 min à 25°C</i>	129
Figure 60: Différentes figures de bridges des filaments XRCC4	135
Figure 61: Distribution des bridaes observée à 10 min en fonction de la concentration de XRCC4	135
Figure 62: Effet de XLF sur la distribution en pourcentage de la longueur des filaments XRCC4	137
Figure 63: Interactions des filaments XRCC4 avec l'ADN indépendamment de la présence d'extrémités libres	138
Figure 64: Distribution en pourcentage de la longeur des filaments XRCC4	139
Figure 65: Condensation des filaments XRCC4 <sub>EI</sub> en présence de l'ADN	140
Figure 66: Condensation des filaments XRCC4 <sub>EL</sub> en présence d'ADN circulaire	141
Figure 67: Condensation des filaments XRCC4-XLF en présence de l'ADN linéaire	141
Figure 68: $XRCC4_{FI}$ , $XLF_{FI}$ et le complexe équimolaire de $XRCC4_{FI}$ et $XLF_{FI}$ interagissent avec l'ADN	145
Figure 69: XRCC4 <sub>EL</sub> bridge l'ADN	148
Figure 70: XRCC4 <sub>FL</sub> bridge l'ADN indépendamment de la présence d'extrémités libres d'ADN	149
Figure 71: Shéma du mécanisme de pontage d'ADN par les protéines	150
Figure 72 : XLF <sub>FI</sub> bridge l'ADN	151
Figure 73 : Interaction de XRCC4-Ligase IV avec l'ADN	153
Figure 74 : Images en microscopie fond noir filtré des complexe ADN-X4L4 en présence d'ATP et Magnésium	154
Figure 75 : Gel d'agarose des produits de ligation	155
Figure 76 : Fixation de l'héterodimère Ku70/Ku80 sur l'ADN (70pb) à 4°C	160
Figure 77 : Fixation de l'héterodimère Ku70/Ku80 sur l'ADN (70pb) à 25°C	161
Figure 78 : Fixation de l'héterodimère Ku70/Ku80 sur l'ADN (70pb) à 37°C	162
Figure 79 : Fixation de l'héterodimère Ku70/Ku80 sur un ADN de 200pb	164
Figure 80 : Fixation de l'hétérodimère Ku70/Ku80 sur un ADN de 200pb pour un temps court d'incubation	165
Figure 81 : Chargement de Ku70/Ku80 sur l'ADN en TEM et AFM	166
Figure 82 : Image en MET de complexe Ku-ADN	167
Figure 83 : Zoom sur les complexes Ku-ADN	168
Figure 84 : Analyse du positionnement de Ku le long de l'ADN en AFM	169
Figure 85 : Les motifs KBM impliqués dans l'interaction avec Ku d'après Némoz et al. 2018	171
Figure 86 : Structures cristallographiques des complexes ADN-Ku-X-KBM et ADN-Ku-A-KBM	172
Figure 87 : Schéma résumant la formation de complexe ADN-Ku-streptavidine	173
Figure 88 : Le complexe ADN-Ku-Streptavidine est stable au cours du temps	174
Figure 89 : XLF bridge les complexes ADN-Ku-streptavidine en présence du domaine KBM	175
Figure 90 : Résumé des essais pour caractériser l'interaction des complexes ADN-Ku-streptavidine avec XRCC	:4 et
XLF	176
Figure 91: Les filaments XRCC4-XLF interagissent avec le complexe ADN-Ku	177
Figure 92: La lamine nucléaire et les constituants du cytosquelette chez les mammifères	182
Figure 93 : L'organisation des filaments XRCC4 en absence de CDBs	183
Figure 94 : XRCC4 implique dans le maintien des extrémités d'ADN proches	184
Figure 95: Recrutement de Ku au niveau des extrémités des CDBs	184
Figure 96: Intégration de XLF dans le filament XRCC4	185
Figure 97 : Interactions du complexe de reconnaissance et du complexe de ligation médiés par XLF	185

# Liste des tableaux

Tableau 1: récapitulatif des réactifs utilisés en PCR avec la taq polymérase ou la longAmp	89
Tableau 2 et 3 de résultats des tests statistique de Spearman pour les 3 variables	132
Tableau 4 et 5 des résutats des tests de spearman dans les groupes des 10 mn	133
Tableau 6 des resultats du test de spearman incluant les données à 37°C aux basses concentrations	134
Tableau 7 des resultats du test de spearman incluant les données à 25°C pour l'impact de XLF sur l'assemb	olage
des filaments	138
Tableau 8 : Les amorces utilisées pour la synthèse des fragments d'ADN	189
Tableau 9 : Conditions PCR pour un fragment d'ADN 1440pb	189
Tableau 10: Conditions PCR pour un fragment d'ADN 800pb	190
Tableau 11: Conditions PCR pour un fragment d'ADN 600pb	190

# Abbréviations

ADNsb : ADN simple brin **AFM** : Atomic Force Microscopy AID : Activation-Induces citydine Desaminase A-EJ : Alternative-End Joining AMP : AdenosineMonoPhosphate **APE1** : APurinic/apyrimidinic Endonuclease 1 **APLF** : Aprataxin and PNKP Like Factor **APTES** : Aminopropyltriethoxy silanes **APTX** : Aprataxin ARNm : ARN messager ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated ATR : Rad3- related protein **BER** : Base Excision Repair **BLM** : Bloom BRCA1 : BReast CAncer 1 **BRCT** : BRCA1 C Terminus CC : Coiled-Coil **CCD** : Charge CoupledDevice **CDBs** : Cassures Double Brin **CHO** : ChineseHamster Ovary CK2 : Casein Ksinase II **CN** : Coloration Négative Co-IP : Co-ImmunoPrécpitation **CPD** : Cyclobutane PyrimiDine CryoEM : Cryo Electron microscopie **CSBs** : Cassures Simple Brin C-ter: C-terminal CtlP : Choline transporter-like Protein **DBD** : DNA Binding Domain **DNA-PKcs** : DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit **EDS** : EnergyDispersive X-ray Spectroscopy **EELS** : Electron EnergyLossSpectroscopy **EM** : Electron Microscopy Exo1 : Exonuclease 1 FAT : FRAP, ATM, TRRAP FATC : FAT C-terminal FEN1 : Flap EndoNuclease-1 FHA: ForkHead-Associated HEAT : Hungtingtin, elongation factor3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1 hPNK : human PolyNucleotide Kinase hRAD51 : human RAD51

HRDC : Helicase and RNase D C-ter **HS-AFM** : High Speed AFM IgM : immunoglobuline membranaire **ITC** : Isothermal Titration Calorimetry **KBM** : Ku Binding Motif keV : kilo-électron-volts kDa: KiloDalton KO: Knock-Out Ku: Ku70/Ku80 KuBsub : Ku Bacillus subtilis Ku<sub>Msme</sub>: Ku Mycobacterium smegmatis LigD : Ligase D Lys : lysine **MEF** : Mouse EmbryonicFibroblasts **MET** : Microscopie Electronique à Transmission MID: middle **mM** : milliMolaire **MMEJ** : Microhomology Mediated End Joining **MMR** : MisMatch Repair MRN: MRE11/Rad50/NBS1 MRX : MRE11/Rad50/Xrs2 MtKu : Mycobacterium tuberculosis Ku NAP1L : Nucleosome Assembly Protein 1 Like NER : Nucleotide Excision Repair **NHEJ** : Non Homologous End Joining **NK** : Natural Killer NLS: Nuclear Localisation Signal **nM** : nanoMolaire NTase : NucleotidylTransferase N-ter : N terminal NucDom : Nuclease Domain **OBD** : OB-fold Domain PAXX : PAralog of XRCC4 and XLF PARP1 : Poly(ADP-Ribose) Polymerase1 **Pb** : paire de bases PI3K : PhosphatidylInositol-3 Kinase **PNKP** : PolyNucleotide Kinase 3'-Phosphatase **PNK** : PolyNucleotide Kinase **PolX** : Polymerase X polyUb : poly ubiquitinylé RAD51 : Radiation sensitivity abnormal 51 **RAG** : RecombinationActivating Gene

**RecA** : Recombinase A RH : Recombinaison Homologue **RI** : Radiations Ionisantes **RNAPII** : RNA polymerase II **RNF8** : RING finger protein 8 **ROS** : Reactive Oxygen Species **RPA** : Replication Protein A **RQC** : RecQcarboxyl terminal **RS-SCID** : RadioSensitive-SCID **SAP** : AF-A/B, Acinus and PIAS SAXS : Small Angle X-rays Scattering SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency siRNA : smallinterfering RNA **SPR** : Surface PlasmonResonance TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase **TRF1** : Telomeric Repeat Factor1 **TRF2** : Telomeric Repeat Factor 2 **UVs** : UltraViolets **vWA** : von Willebrand A

WRN : Werner **XIR** : XRCC4 Interacting Region **XLF** : XRCC4 Like Factor **XRCC1** : X-Ray Cross-Complementing group 1 **XRCC4** : X-Ray Repair Cross Complementing 4 **XRCC5** : X-ray Repair Cross Complementing protein5 **XRCC6** : X-ray Repair Cross Complementing protein6 X4L4 : XRCC4-ligaseIV β- CASP : metallo-β-lactamasesassociated CPSF ARTEMIS SNM1 PSO2 **µM** : micromolaire **γ-H2AX** : **3'P**: 3' phosphate **3'PG**: 3' phosphoglycolate **5'-dRP** : 5'-desoxyribose phosphate **5'OH** : 5' hydroxyle **6-4PP** : Pyrimidine-Pyrimidone (6-4)

# **A-Introduction**

Dans la cellule, l'ADN subit de nombreuses agressions d'origines endogènes ou exogènes qui engendrent différents types de lésions. On estime qu'une cellule subit quotidiennement environ 10<sup>5</sup> lésions d'ADN (1). Les plus connues sont les modifications de bases, les mésappariements de bases, la formation de sites abasiques (dépurination, dépyrimidation), les pontages ADN/ADN, les pontage ADN/protéine, les cassures simple-brins et enfin les cassures double-brins (CDBs) (1). Ces dommages sont pris en charge par différentes voies de réparation en fonction de leur nature. On peut citer la voie BER (*Base Excision Repair*) qui prend en charge la réparation des bases endommagées (2), la voie NER (*Nucleotide Excision Repair*) qui répare les nucléotides modifiés (3), la voie MMR (*MisMatch Repair*) qui répare les mésappariements des nucléotides (4), la RH (*Recombinaison Homologue*) et la voie NHEJ (*Non Homologous End Joining*) qui réparent les cassures double-brin (CDBs) d'ADN (5). La détection de ces lésions et la mise en place d'une réponse appropriée sont des processus hautement contrôlés qui impliquent plusieurs assemblages protéiques.

Chez les mammifères, la réparation des CDBs par la voie NHEJ repose sur la ligation directe des extrémités 3'OH et 5'P par la Ligase IV. Cette voie de réparation implique plusieurs protéines organisées en 3 complexes multiprotéiques : (i) le complexe de reconnaissance (Ku70/Ku80) ; (ii) le complexe de maturation qui contient des enzymes impliquées dans la maturation des extrémités comme la kinase DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit) ; les nucléases Artémis et APLF (Aprataxin and PNKP Like Factor) et des polymérases ; et (iii) le complexe de ligation comprenant XRCC4 (X-Ray-sensitive Cross-Complementing group 4), XLF (XRCC4 Like Factor) et la Ligase IV (6). Récemment un nouveau partenaire du complexe de ligation a été mis en évidence nommé PAXX (PAralog of XRCC4 and XLF) (7). Comme pour XRCC4 et XLF, PAXX stimulerait l'activité de la Ligase IV, mais le mécanisme par lequel ils stimulent la ligation n'est pas clairement établi (8).

Dans les cellules humaines, des translocations chromosomiques et des réarrangements génétiques inappropriés peuvent être générés au cours du NHEJ (9). Le maintien des extrémités issues des cassures double brin d'ADN proches en vu de la ligation est indispensable pour une réparation correcte de ces lésions. Pendant longtemps, on a considéré que Ku était l'acteur qui reliait les extrémités permettant leur ligation (10)(11). Cette hypothèse fut réfutée pour attribuer ensuite ce rôle à DNA-PKcs (12)(13).

15

Cependant, DNA-PKcs n'est pas toujours présent dans ce processus chez les mammifères (14), et en outre elle n'a pas d'équivalent chez les eucaryotes inférieurs (15)(16). Des données plus récentes ont permis de proposer que les partenaires du complexe de légation XRCC4 et XLF pourraient jouer un rôle dans le maintien des extrémités proches. Une étude récente réalisée dans mon laboratoire d'accueil en collaboration avec le CEA de Saclay qui combinait la microscopie électronique à transmission (MET) et la cristallographie, a permis de montrer que les protéines tronquées du complexe de ligation XRCC4<sub>(1-157)</sub> (protéine sans la partie C-terminal (C-ter) et sans une partie du domaine Coiled-Coil (CC)) et XLF<sub>(1-224)</sub> (sans la partie C<sub>ter</sub>) (chacune sous forme de dimères) s'organisent en longs filaments hélicoïdaux (17).

Il a été proposé que ce filament puisse jouer un rôle structurant dans l'assemblage des complexes multiprotéiques qui sont au cœur de la machinerie du NHEJ. Cela a permis l'émergence de nouveaux schémas de la voie NHEJ qui incluait le filament XRCC4/XLF. Cependant, ces modèles ne pouvaient pas prendre en compte l'impacte des domaines C terminaux des deux protéines entières XRCC4 et XLF (18)(19).

En utilisant des approches de Microscopie Electronique à Transmission (MET), de cryomicroscopie (CryoEM), de Microscopie à Force Atomique (AFM), combinées à des outils plus classiques de biochimie, j'ai étudié les propriétés structurales et fonctionnelles du complexe de ligation avec les formes entières et mutées des protéines (Ligase IV, XRCC4<sub>FL</sub>, XLF<sub>FL</sub>) et du complexe de reconnaissance (Ku-ADN). Enfin nous avons proposé un modèle d'assemblage des partenaires de la voie NHEJ.

## I- Les cassures double brins

## I-1- L'origine des CDBs

Les cassures double brin (CDBs) résultent d'une rupture au niveau des deux chaines sucrephosphate complémentaires d'ADN. Généralement elles résultent de deux cassures simple brins (CSBs) sur les deux brins opposés, séparées ou non par quelques nucléotides. La majorité des CDBs dans la cellule sont produites par des agents d'origine endogènes (intracellulaire) (20)(21)(22) ou exogènes (environnement) (23)(24). Parmi les origines endogènes, citons en particulier les ROS (*Reactive Oxygen Species*), produits du métabolisme oxydatif cellulaire qui sont à l'origine de la plupart des dommages à l'ADN, au niveau des bases comme sur la chaine sucro-phosphate (20). Au niveau de la liaison phosphodiester entre deux nucléotides successifs, ils sont à l'origine de cassures simple brin (25). Au niveau des bases, ils génèrent de nombreuses modifications (8-oxo-G, 8-oxo-A, thymine glycol, 5-hydroxy-C, ethno-A) ou des pontages (26).

Pour ce qui est des CDBs liés à l'environnement, certaines résultent de facteurs exogènes comme l'exposition à différents types de rayonnements (UV, radiations ionisantes...). Les radiations ionisantes (RI, rayons X,  $\gamma$ ...) induisent différents types de dommages à l'ADN dont des cassures simple ou double brin (24). Les rayons ultraviolets (UVs) induisent la formation de dimères CPD (cyclobutane pyrimidine) ou de photo-produits de 6-4PP (pyrimidine-pyrimidone (6-4)). Certaines lésions génèrent une cassure simple-brin pouvant être à l'origine de CDBs lors de la progression des fourches de réplication (23)(27). Il est à noter que certaines chimiothérapies affectent l'ADN comme les agents alkylants (methanesulfonate de méthyl), les agents de pontage (Mitomycine C et cisplatine) ou les radiomimétiques (bléomycine) et enfin les inhibiteurs des topoisomérases (camptothécine et l'étoposide) qui induisent la formation de cassures simple et double-brins en maintenant le complexe ADN-topoisomérase dans un interaction covalente (28)(29)(30)(31).

Certaines CDBs sont programmées au cours de processus physiologiques qui comportent des réarrangements d'ADN. Lors d'une réponse immunitaire, les CDBs sont réalisées par différentes nucléases comme les RAG (*Recombination Activating Gene*) au cours la recombinaison V(D)J lors de la différentiation des lymphocytes (32)(33) ou par l'action combinée de plusieurs enzymes incluant AID (*Activation-Induces-citydineDesaminase*) et APE1 (*apurinic/apyrimidinicendonuclease 1*) au cours de la commutation isotypique (commutation de classe) des immunoglobulines membranaires (IgM) des lymphocytes B matures (34)(35). Dans les cellules sexuelles, les CDBs sont programmées et induites par

une enzyme SPO11 (36). Elles permettent la reconnaissance des chromosomes homologues lors de la première prophase de la méiose et sont à l'origine de la diversité génétique grâce aux réarrangements génétiques au cours de la reproduction sexuée.

## I-2- L'hétérogénéité des CDBs

Dans la cellule, les CDBs présentent une multitude d'extrémités de nature très diverses (franches, cohésives, directement liables ou non). Leurs natures orientent le choix de la voie de réparation et donc les protéines impliquées. Leurs maturations impliquent essentiellement des exonucléases et des polymérases qui comblent les gaps et peuvent former des flaps, lesquels sont éliminiés par des endonucléases spécifiques (37)(38). Certaines extrémités portent des modifications au niveau du sucre ou des bases azotées (figure 1). Ces modifications varient en fonction de la source du dommage (39). Les CDBs générées par les RI et le stress oxydatif ont une extrémité 3' phosphate (3'PG) (25)(40). Aux extrémités 5' le stress oxydatif génère des extrémités avec des groupements 5' hydroxyle (5'OH) ou 5' aldéhyde (41)(42). Des CDBs avec des extrémités modifiées sont obtenues lors des étapes intermédiaires de la réparation par excision de base (BER), à l'extrémité 5' on a 5'-desoxyribose phosphate (5'-dRP) et à l'extrémité 3' un groupement aldéhyde 3'phospho insaturé (43)(2).





Les CDBs sont des lésions complexes. Dans cette figure sont illustrées quelques configurations des CDBs. Certaines CDBs portent des modifications au niveau des sucres et des bases. Figure adaptée de Lieber MR et Wilson TE (44).

## II- La réparation des Cassures Double Brins de l'ADN

Dans la cellule, les CDBs sont prises en charge par deux voies principales de réparation conservées au cours de l'évolution, la *recombinaison homologue* (RH) et *la jonction des extrémités non homologues* (NHEJ : *Non Homologous End Joining*) (5). Ces deux voies utilisent différents mécanismes de réparation. Alors que la RH répare les dommages en utilisant une séquence homologue comme matrice (45), la voie NHEJ répare par ligature directe des extrémités (46). Au cours de ces dernières années, une autre voie de réparation par jonction des extrémités a été mise en évidence et nommée A-EJ (*Alternatif End Joining*). Comme son nom l'indique, cette voie fait appel à d'autres protéines que la voie NHEJ classique. Elle repose sur la présence de microhomologies de séquences de part et d'autre de la lésion (47). Le choix de la voie de réparation qui prend en charge ces lésions est un processus complexe qui tient compte de plusieurs paramètres en particulier, la nature des extrémités, le cycle cellulaire, la régulation de l'activité des nucléases impliquées dans la résection et la présence des partenaires des voies de réparation (48)(49)(50).

## II-1- La réparation par recombinaison homologue

Les acteurs de la recombinaison homologue sont conservés chez tous les organismes vivants allant des bactéries à l'homme ainsi que chez certains bactériophages et virus (51). La RH joue un rôle central à la fois dans la maintenance des génomes incluant la réparation des CDBs et la réactivation des fourches de réplication bloquées (52)(53). Elle est aussi considérée comme vecteur de la diversité des génomes puisqu'elle est impliquée dans les réarrangements génétiques intervenant lors de la méiose pour la reproduction sexuée (54) mais aussi dans la transformation bactérienne (55). Son mécanisme repose sur l'utilisation d'une séquence homologue comme matrice pour réparer le brin d'ADN endommagé. En phase S et G2 du cycle cellulaire, la chromatide sœur est utilisée comme matrice ainsi les dommages sont réparés fidèlement sans conséquence génétique (56)(57)(58). Dans les cellules diploïdes, en phase G1 du cycle cellulaire, le chromosome homologue peut être utilisé comme matrice. Une altération dans ce type d'événement peut engendrer une perte d'hétérozygotie ou certaines instabilités génétiques à l'origine de cancers (45)(59)(60).

La résection, c'est à dire la dégradation d'un brin d'ADN dans le sens  $5 \rightarrow 3$  et la formation d'un ADN simple brin 3'OH de part et d'autre du dommage, oriente la réparation de ces lésions vers la RH (61)(62). De nombreuses études suggèrent que la résection se fait en deux étapes impliquant des nucléases et des hélicases (63)(64). Chez les

mammifères, la nucléase Mre11 initie la résection sur quelques nucléotides dans le sens  $3' \rightarrow 5'$  (48)(65)(66) en présence de CtlP (choline transporter-like protein) (67)(68), suivi d'une extension de la résection par l'exonucléase Exo1 (Exonuclease 1) dans le sens 5'→3' en présence de l'hélicase BLM (*Bloom*), et l'hélicase/nucléase Dna2 (69)(70)(71). BRCA1 (BReast CAncer 1) un gène suppresseur de tumeurs joue un rôle dans la maintenance du génome (72) et la résection de l'ADN au niveau des CDBs (73)(74). BRCA1 interagit physiquement avec CtIP et augmente la vitesse de la résection dépendante de ce dernier (75). CtIP et BRCA1 favorisent la résection en recrutant Dna2 au niveau des CDBs (76). Les extrémités d'ADN simple-brin générées sont recouvertes par RPA (Replication protein A), protéine de liaison à l'ADN simple brin (ADNsb). Ainsi, RPA recouvre l'ADNsb formé, empêchant la formation de structures secondaires et le protègeant du clivage par les nucléases (77). Dans la suite du processus, RAD51 (Radiation sensitivity abnormal 51) est chargé sur l'ADNsb recouvert par RPA par un médiateur pour former le filament présynaptique. RAD51 est la recombinase eucaryote ATP dépendante de la famille RecA (Recombinase A) dont la fonction, mais pas la séquence en acides aminés, est conservée au cours de l'évolution (78)(79).

RAD51 humain (hRAD51) polymérise sur l'ADNsb et forme une structure hélicoidale de chiralité droite (80)(81). La nucléation de hRAD51 sur l'ADNsb pour former le filament présynaptique est facilitée par des médiateurs comme surtout BRCA2 (82)(83). L'extension du filament et sa régulation impliquent les paralogues de RAD51 (RAD51B-RAD51C) et peut être RAD52 (84)(85). Les filaments formés peuvent être toxiques ou hyper-recombinogènes et sont à l'origine de situations critiques pour la cellule. En collaboration avec X. Veaute (CEA Fontenay aux Roses), l'équipe a montré que l'activité translocase de certaines hélicases comme Srs2 chez la levure peut réguler négativement le filament en le déstabilisant (86). Chez l'homme, certaines translocases comme hRTEL, hPARI, hFBH1, BLM et hRECQL5 ont aussi été décrites comme ayant des activités anti-recombinases régulant négativement le filament hRAD51 (87). Ces dernières années ont permis de montrer que le filament RAD51-ADNsb contient des protéines accessoires comme les paralogues de RAD51, RAD52, voire RAD54, qui participent à son activité et à sa régulation.

Le nucléofilament hRAD51 catalyse la recherche d'homologie, l'appariement entre l'extrémité simple brin envahissante et le duplex de l'ADN matrice (88)(89). L'échange de brins d'ADN implique RAD54 grâce à son activité de migration de branche (90)(91)(92). La RH peut intervenir dans des réactions avec ou sans crossing-over. Lorsqu'il y a des

jonctions de Holliday leur migration et leur résolution sont ensuite prises en charge par différentes enzymes, en particulier les résolvases (93)(94)(95)(96)(figure 2).

La recombinaison homologue prend en charge les différents types de CDBs, l'étape initiale de résection permet d'éliminer les structures complexes ainsi que les différentes modifications des extrémités.



Figure 2 : La réparation par recombinaison homologue

La réparation est initiée par la résection des extrémités d'ADN par l'action combinée du complexe MRN, de protéines accessoires CtIP et BRCA1, de la nucléase ExoI et de l'hélicase BLM qui catalysent la génération d'une région d'ADNsb qui sera protégée par RPA. Dans la suite du processus RAD51 remplace RPA avec l'aide de BRCA2 le médiateur de recombinaison RAD52 et les paralogues RAD51 (RAD51-B, RAD51-C, RAD51-D, XRCC2 et XRCC3) et se polymérise en filament sur l'ADNsb. RAD51 catalyse la recherche d'homologie, l'appariement et l'échange de brin, soutenu par RAD54. Figure adaptée de Rositsa Dueva et George Iliakis (97)

## II-2- La réparation par jonction des extrémités

La jonction des extrémités est un autre mode de réparation des CDBs qui ne nécessite pas la présence de séquences homologues. Ainsi, ce mode est actif tout au long du cycle cellulaire. Ce mécanisme est utilisé par la voie NHEJ classique et par un mécanisme alternatif de jonction des extrémités connu sous le nom A-EJ (*Alternative End Joining*). Ces deux voies de réparation sollicitent différentes protéines et elles utilisent différents mécanismes (47). La voie NHEJ classique est dépendante de l'hétérodimère Ku70/Ku80 et de la Ligase IV et elle répare par jonction directe des extrémités (18). Alors que le A-EJ nécessite une microhomologie de séquence de part et d'autre de la lésion pour l'alignement des extrémités avant la jonction par la ligase III (98).

## a- La voie NHEJ Classique

La voie NHEJ classique est l'une des deux voies principales de réparation des CDBs. Son mécanisme de réparation repose sur la jonction directe des extrémités d'ADN par la Ligase IV (99), qui restaure la liaison covalente phosphodiester entre deux nucléotides successifs (100). Contrairement à la RH, la réparation par la voie NHEJ ne nécessite pas d'homologie de séquence et elle est active tout au long du cycle cellulaire (101). Les acteurs clés de cette voie de réparation incluent l'hétérodimère Ku70/Ku80, Ligase IV, XRCC4 et XLF qui sont conservés chez les organismes eucaryotes allant des levures aux mammifères (102). Récemment un nouveau partenaire a été découvert chez les mammifères et a été nommé PAXX (PAralog of XRCC4 and XLF) (7)(8). Les lignées cellulaires humaines et de souris avec des mutations au niveau d'un des acteurs de la voie NHEJ présentent une sensibilité accrue aux RI (103). Les lignées de souris MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) dépourvues de Paxx (Paxx<sup>-/-</sup>) sont aussi sensibles aux RI (104). Les levures utilisent principalement la RH pour réparer les CDBs. Dans ces organismes, la perte de Ku engendre une hypersensibilité aux RI uniquement quand il y a un défaut dans la RH (105). De même un défaut dans les autres acteurs du NHEJ chez les levures incluant Dnl4 (homologue de Ligase IV), Lif1 (homologue de XRCC4) et Nej1 (homologue de XLF) n'engendre pas de sensibilité aux RI (106).

Comme pour la RH, la voie NHEJ prend en charge les CDBs accidentelles d'origine endogènes et exogènes incluant celles produites suite à l'exposition aux RI (107)(108). Comme je l'ai indiqué précédemment, les CDBs accidentelles sont de nature hétérogène et présentent des modifications aux extrémités. Au cours du NHEJ une étape dite de maturation est nécessaire pour obtenir des extrémités 5'P et 3'OH essentielles pour la ligation par la Ligase IV. Plusieurs enzymes interviennent dans cette étape incluant des ADN polymérases, des nucléases, des kinases et des hélicases.

Chez les mammifères, la voie NHEJ répare aussi les CDBs programmées lors de la recombinaison V(D)J au cours de la différentiation des lymphocytes T et B (109) et les CDBs programmées lors de la commutation isotypique des lymphocytes B matures au cours d'une réponse immunitaire (110). Chez l'homme un défaut dans la voie NHEJ engendre une immunodéficience combinée sévère (*SCID* (*Severe Combined Immuno Deficiency*)) caractérisée par un blocage de la différenciation des lymphocytes T associé ou non à un développement anormal d'autres lignées immunitaires incluant les lymphocytes B et les cellules NK (Natural Killer). Les patients présentent des phénotypes particuliers comme des microcéphalies et des retards de croissance (111)(112). Il existe une sous classe de patients *SCID* qui présentent une sensibilité accrue aux RI nommé *RS-SCID* (*RadioSensitive-SCID*) (113). A ce jour, des mutations dans quatre gènes codants pour des composants du NHEJ, *LIG4* (codant Ligase IV), *PRKDC* (codant DNA PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit)), *DCLRE1C/SNM3/Artemis* (codant Artémis) et *XLF* (codant XLF) ont été identifiées chez les patients *SCID* (114)(115).

Au cours des dix dernières années des composants du NHEJ ont été découverts dans plusieurs bactéries phylogénétiquement distinctes y compris les *mycobactéries*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* (116)(117)(118). L'homodimère Ku et la ligase D sont les composants majeurs de la voie NHEJ bactérienne (119)(120).

#### al-Mécanisme du NHEJ classique chez les bactéries

La première preuve de l'existence de la voie NHEJ chez les bactéries provient des analyses bio-informatiques qui révèlent la présence d'homologues de Ku dans certaines familles de bactéries. L'analyse phylogénétique montre que ce gène est absent dans la famille des entérobactéries (ex *E.Coli*) (121). Le gène qui code pour Ku est souvent dans un opéron lié avec un autre gène qui code pour une ligase ATP dépendante (figure 3) (122)(123).



*Figure 3: Organisation en opérons contenant les gènes qui codent pour Ku et la ligase chez les bactéries* Figure adaptée de MacNeill *et al.* (123).

L'homodimère Ku bactérien est issu de l'expression d'une seule copie du gène (124). Les protéines Ku bactériennes ont une taille d'environ 30 à 40 kDa et existent donc uniquement sous forme d'homodimères. Elles contiennent un domaine central conservé (Ku Core) qui présente une homologie de séquence avec le domaine central Ku chez les eucaryotes (figure 4A) (125). Ce domaine est impliqué dans la dimérisation et la liaison à l'ADN en formant une structure en anneau (prédiction de structure par modélisation moléculaire) (figure 4B) (121). La majorité des homodimères Ku (92,9%), ont en plus du domaine central (Ku core) une extension N-terminale de 5 résidus au moins et une région C-terminale allant de 19 à 173 résidus. Les alignements de séquences ont mis en évidence deux domaines distincts dans la partie C-ter, un domaine C-ter minimal (minimal  $C_{ter}$ ), suivi d'un domaine C-terminal étendu (extented  $C_{ter}$ ). Alors que le domaine minimal du  $C_{ter}$  est conservé entre les différentes bactéries, la partie étendue de ce domaine  $C_{ter}$ , riche en acides aminés basiques, varie entre 1 à 155 résidus et ne partage aucune similitude de séquences (figure 4C) (119).



#### Figure 4: L'homodimère Ku

A- Structure des différents domaines de la protéine Ku incluant un domaine central conservé (Ku core) chez différents organismes procaryotes et eucaryotes(125). B- Structure cristallographique de l'hétérodimère eucaryote Ku70/Ku80 avec l'ADN, modèle de l'homodimère Ku (modélisation moléculaire)(121). C- Alignements de séquences d'acides aminés de protéines Ku en utilisant la méthode d'alignement de séquences multiples de Clustal Omega de différentes espèces bactériennes Bacillus subtilis (Bsub, NCBI Reference Sequence: NP 389224.1), Pseudomonas aeruginosa (Paer, YP 791093.1), Mycobacterium smegmatis (Msme, YP 889815.1), Mycobacterium tuberculosis (Mtub, NP 215453.1) et Geobacter Uraniireducens (Gura, YP 001232184.1). Le domaine central (Ku core) en gris, le domaine C-ter minimal (minimal C<sub>ter</sub>) en bleu et l'extension C-ter (extended C<sub>ter</sub>) en jaune. Les résidus conservés entre les protéines Ku sont indiqués par un astérisque. Figure adaptée de McGovern,S *et al.* (119).

Le système NHEJ bactérien ne comporte que deux protéines, un homodimère Ku et une ligase multifonctionnelle (LigD). La Ligase D contient plusieurs domaines enzymatiques dont l'activité est nécessaire pour nettoyer et relier les extrémités. L'organisation de ces domaines varie en fonction des espèces. Dans certaines espèces, LigD ne possède pas tous les domaines, comme par exemple LigD de *B. subtilis* qui ne contient pas de domaine nucléase (NucDom) (126)(127)(121) (figure 5).

#### Mycobacterium tuberculosis



Figure 5: Organisation des multi domaines de LigD

Les ligases D bactériennes ont une activité polymérase, nucléase et ligase ou seulement polymérase et ligase comme dans *B. subtilis*. Figure adaptée de Doherty, A.J *et al.* (122).

La caractérisation biochimique de l'homodimère Ku chez *Mycobacterium tuberculosis* (MtKu) montre qu'il se lie aux extrémités d'ADN libres indépendamment de la séquence et glisse vers l'intérieur. Une fois fixé à l'ADN, MtKu recrute Mt-LigD et stimule son activité (116)(128). Bien que la majorité des homodimères Ku se lient aux extrémités d'ADN libres, Ku *Bacillus subtilis* (Ku<sub>Bsub</sub>) se lie aux extrémités d'ADN libres mais aussi aux ADNs double brin circulaires. Cette interaction est médiée par l'extrémité C-ter riche en lysine. Ce domaine empêche le glissement de Ku vers l'intérieur (119).

#### a2- La voie NHEJ classique chez les eucaryotes

Comme pour le NHEJ bactérien, Ku est impliqué dans la reconnaissance des CDBs et l'initiation de la réparation par la voie NHEJ chez les eucaryotes. Cependant chez les eucaryotes, Ku existe sous forme d'hétérodimère Ku70/Ku80 (129).

Après fixation à l'ADN, le complexe (ADN-Ku) permet le recrutement des protéines impliquées dans la maturation des extrémités (130). En fonction du type cellulaire et de la nature des extrémités, différents partenaires peuvent intervenir. Chez les levures, les protéines impliquées dans la maturation des extrémités de l'ADN sont différentes de celles caractérisées chez les mammifères. Ainsi l'activité nucléase est assurée pas le complexe MRX (MRE11/Rad50/Xrs2) (131)homologue du complexe **MRN** (MRE11/RAD50/NBS1) chez les mammifères et qui est lui impliqué dans la RH (62). De la même manière les polymérases qui comblent les résections engendrées par l'action des nucléases sont différentes, Pol4 est la polymérase décrite chez les levures (132)(133). Chez les mammifères, après fixation à l'ADN, le complexe ADN-Ku recrute DNA-PKcs et forme une holoenzyme active DNA-PK (134) (figure 6). La fixation de DNA-PKcs entraine une translocation de Ku vers l'intérieur, ainsi DNA-PKcs se fixe à environ 10 pb et se positionne à l'extrémité de l'ADN bloquant ainsi l'accès aux extrémités des autres partenaires (135). DNA-PKcs s'autophosphoryle ce qui induit un changement de conformation qui la dissocie des extrémités d'ADN permettant ainsi aux autres partenaires du NHEJ d'y accéder (136)(13)(137)(138). Artémis est recruté aux extrémités de manière à ce que son activité endonucléase puisse intervenir dans la maturation de l'ADN. Au cours de la recombinaison V(D)J, elle est nécessaire au clivage des structures en hairpin (épingle à cheveux) formées par les protéines RAG (Rag1/Rag2) (139)(140). Artémis est aussi importante au cours de la maturation des extrémités de CDBs non programmées (141). D'autres enzymes sont impliquées dans cette étape incluant PNKP (PolyNucleotide Kinase 3'-Phosphatase), APTX (Aprataxin) (142), APLF (Aprataxin and PNKP Like Factor) (143)(144) et WRN (Werner). PNKP présente une activité 5' kinase et 3' phosphatase, elle restaure des extrémités compatibles 5' phosphate et 3' hydroxyle (145). L'Aprataxin enlève les adduits AMP (Adenosine Mono Phosphate) aux extrémités 5' des intermédiaires de ligation et restaure ainsi une extrémité 5' phosphate pour la ligation. APLF présente une activité  $3' \rightarrow 5'$  exonucléase et une activité endonucléase qui dépend de la présence de sites abasiques. WRN (Werner) qui appartient à la grande famille des hélicases RecQ; présente une activité exonucléase  $3' \rightarrow 5'$  et une activité hélicase, qui prennent en charge une variété de substrats d'ADN, y compris les bulles, des structures en tige-boucle, les fourches et les jonctions de Holliday (146)(147)(148). Des polymérases de la famille PolX incluant la polymérase  $\mu$  et la polymérase  $\lambda$  sont impliquées dans le remplissage des gaps ou l'extension des extrémités (149). La polymérase  $\lambda$  complète les nucléotides manquants lorsque les extrémités s'alignent sans complémentarité (150). La polymérase µ complète les vides lorsque les extrémités sont partiellement complémentaires (151).

La dernière étape de cette voie de réparation est la ligation par la ligase qui restaure la liaison phosphodiester entre deux extrémités 5'P et 3'OH (152). Chez les eucaryotes, la ligase fait partie d'un complexe multiprotéique connu sous le nom de complexe de ligation (figure 6). Les partenaires du complexe de ligation Dnl4/Lif1/Nej1 chez les levures ont pour homologues chez les mammifères Ligase IV/XRCC4/XLF respectivement (153). Les ligases Dnl4 et Ligase IV sont des homologues fonctionnelles de la ligase D procaryote et elles assurent l'étape finale de ligation. Alors que la ligase D chez les bactéries est une protéine multifonctionnelle et assure seule la ligation des extrémités. Chez les eucaryotes Lif1/XRCC4 et Neg1/XLF stimulent l'activité de ligation des Igases (154)(155). Même si la voie NHEJ est impliquée dans la réparation des CDBs chez les levures et les

mammifères et que des protéines homologues existent chez les deux espèces, les effets de mutation de ces protéines sont plus importants chez les mammifères comparés à ceux observés chez les levures (106).



Figure 6: Modèle simple du NHEJ chez les mammifères

#### b- La voie du Alternative-End Joining

La détection d'une activité résiduelle de jonction des extrémités chez les levures mutées dans un des acteurs clés du NHEJ (Ku70, Ku80 ou Ligase IV), suggère l'existence d'une autre voie de réparation par jonction des extrémités (156)(157). Cette voie de réparation a longtemps été nommée NHEJ alternatif (NHEJ-A) par opposition au NHEJ classique dépendant de Ku et Ligase IV. Actuellement on utilise plus le terme A-EJ (*Alternatif-end joining*) (158). Elle est aussi connue sous le nom de MMEJ (*Microhomology Mediated End Joining*) puisqu'elle utilise des microhomologies de séquence de part et d'autre de la lésion. Ces microhomologies sont essentielles à l'alignement des deux extrémités d'ADN avant la ligation (159)(160). Pour éviter toute confusion, on utilise le nom générique A-EJ au lieu du terme MMEJ ou NHEJ-A et on définit cette voie comme un mécanisme de

Les CDBs sont reconnues par l'hétérodimère Ku70/Ku80 qui recrute à son tour la sous-unité catalytique de la DNA-PK et forme une holoenzyme active DNA-PK. Les extrémités d'ADN sont maturées par différentes enzymes en fonction de la nature du dommage. Une fois les extrémités 3'OH et 5'P restaurées, la Ligase IV les relie en présence de XRCC4 et XLF. Figure adaptée de Dueva, R. and Iliakis, G (97).

jonction d'extrémités indépendant de Ku et Ligase IV. Dans les cellules humaines la voie A-EJ utilise des microhomologies de séquences de 4pb à 10pb minimum (161). Depuis sa découverte, la voie A-EJ a été mise en évidence dans plusieurs organismes incluant *les mycobactéries* (162), les *caenorhabditis elegans* (163), ainsi que les mammifères (164)(98). Elle prend en charge la réparation des CDBs accidentelles (165) ainsi que les CDBs programmées lors de la commutation de classe isotypique en absence des acteurs clés de la voie NHEJ classique tels que l'hétérodimère Ku70/Ku80 et la Ligase IV (166)(167).

La première étape dans la réparation par la voie A-EJ est la reconnaissance des lésions et la fixation de PARP1 (poly(ADP- ribose) polymerase-1) au niveau des CDBs. PARP1 est un détecteur des dommages d'ADN qui reconnait à la fois les cassures simple et double brin (168)(169). En présence de CDBs, PARP1 est en compétition avec Ku pour se fixer aux extrémités d'ADN (170), la découverte que Ku inhibe le recrutement de PARP1, suggère que la suppression de la voie A-EJ est principalement attribuée à la présence de Ku aux extrémités (171). Une fois active, PARP1 est impliquée dans la polyADP-ribosylation de nombreuses protéines. La polyADP-ribosylation est une modification post traductionnelle (ajout de PolyADP-riboses). Elle joue un rôle important dans la réponse aux dommages de l'ADN. La PARP est une cible prometteuse dans le traitement du cancer dans les chimiothérapies adjuvantes (172). Les inhibiteurs de PARP1 augmentent la sensibilité aux agents radiomimétiques des cellules déficientes pour Ku (173). Par ailleurs, des expériences biochimiques dont des essais de ligation dans les cellules déficientes en Ku ont permis de confirmer l'implication de PARP1 dans la voie A-EJ (170)(174)(175). Dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) déficientes en Ku, l'inhibition chimique et la répression de PARP1 (traitement des cellules avec siARN contre l'ARNm codant pour PARP1) entraîne un défaut dans la réparation des CDBs chromosomiques induites par la nucléase I-SceI indiquant qu'in vivo le A-EJ est dépendant de PARP1 (176). Dans cette voie de réparation, PARP1 est directement impliqué dans le recrutement des autres partenaires incluant XRCC1 (177)(178) et la Ligase III (179). La deuxième étape dans ce processus de réparation par la voie A-EJ est la résection limitée sur quelques nucléotides par la nucléase Mre11 en présence de CtlP pour révéler des microhomologies de séquences de part et d'autre de la lésion (180)(181)(182). Dans cette étape dite de maturation d'autres enzymes sont décrites comme essentielles dans la réparation par la voie A-EJ incluant la polymérase  $\theta$  (pol $\theta$ ) (183), la nucléase FEN1 (Flap EndoNuclease-1) essentiellement son activité endonucléase (184), la kinase hPNK (human PolyNucleotide Kinase) (174) et l'hélicase exonucléase WRN (185). Une fois fixé à l'ADN WRN inhibe le recrutement de Mre11 et CtlP et empêche ainsi une résection excessive des extrémités (185). La dernière étape dans cette voie de réparation est la ligation des extrémités, la microhomologie de séquence de part et d'autre d'une CDB permet l'hybridation et l'alignement des extrémités d'ADN avant la ligation par ligase III en présence de XRCC1 (173)(186)(187)(figure 7).



*Figure 7: Modèle simple de la voie Alternative End Joining chez les mammifères* 

Les CDBs sont reconnues par PARP1, le complexe MRE11 en présence de CtlP est implique dans la résection et la mise en évidence des microhomologies, la ligation par ligase III en présence de XRCC1 ou par ligase I. Figure adaptée de Deriano,L. et Roth,D.B (188)

XRCC1 est une protéine d'assemblage (scaffold protein) et de stabilisation. XRCC1 stabilise la ligase III de façon similaire à XRCC4 avec la Ligase IV. En effet le niveau de protéines ligase III diminue drastiquement dans les cellules déficitaires en XRCC1 (189)(190). La ligase I est aussi impliquée dans le A-EJ puisque l'utilisation de siRNA contre Ligase I induit une réduction de ligation médiées par des microhomologies de 2, 3 ou 10 pb (191). Dans les cellules murines dépourvues de ligase I, la fréquence de translocations chromosomiques n'est pas affectée alors que dans les cellules dépourvues de ligase III, cette fréquence diminue drastiquement (187). Ces données montrent que les deux ligases fonctionnent de manière hiérarchique. La ligase I pourrait agir comme une ligase de secours en absence de ligase III (187). La voie A-EJ est un mécanisme de réparation mutagène associée à des délétions dans la séquence d'ADN et qui contribuent aux translocations chromosomiques et aux réarrangements génétiques à l'origine de l'instabilité génétique et de certains cancers (192)(193).

# III- Les protéines impliquées dans la voie NHEJ chez les mammifères

## III-1- L'hétérodimère Ku70/Ku80

Ku a été identifié au début des années 1980 comme un autoantigène ciblé par des autoanticorps dans le sérum de patients atteint du syndrome polymyositis scleroderma overlap, une maladie auto-immune de la famille des sclérodermies (du grec " skleros " : dur, et " derma " : peau, sclérodermie signifie en effet " durcissement de la peau "). Le nom Ku provient des deux premières lettres du nom du patient dont le sérum a permis d'isoler l'autoantigène (194). Chez les eucaryotes, Ku existe sous forme d'hétérodimères composés de deux sous-unités : Ku70 (70 KDa pour 609 acides aminés) et Ku80 (86 kDa pour 732 acides aminés) (195). Ces protéines sont conservées tout au long de l'évolution, des homologues de Ku sont retrouvés dans des organismes allant des bactéries à l'homme (123)(124). Les gènes qui codent pour Ku80 et Ku70 humains sont désignés par XRCC5 (X-ray Repair Cross Complementing protein 5) et XRCC6 (X-ray Repair Cross Complementing protein 6) respectivement. Ku est une protéine très abondante (on estime environ à 4 10<sup>5</sup> le nombre de molécules par noyau de cellule HeLa). Ku est détecté dans la plupart des cellules humaines étudiées jusqu'à présent (194)(196)(197)(198). Elle est localisée essentiellement dans le noyau où elle joue un rôle central dans la réparation des dommages de l'ADN. Dans certaines conditions et certains types cellulaires, Ku est localisée dans le cytoplasme ou la membrane cellulaire (199)(200)(201). Bien qu'elle joue un rôle majeur dans le NHEJ, Ku est aussi essentielle dans la régulation des télomères ainsi que dans la régulation de nombreux gènes où elle agit comme facteur de transcription (202).

## a- Les fonctions de l'hétérodimère Ku70/Ku80

#### al-Ku dans le NHEJ

Au cours de la réparation par la voie NHEJ, Ku joue plusieurs rôles incluant la reconnaissance des CDBs et l'initiation de la réparation par la voie NHEJ. Après l'induction de CDBs, l'hétérodimère Ku est rapidement localisée au niveau des lésions indépendamment de la présence des autres acteurs du NHEJ (203)(204). Ku présente une très forte affinité pour l'ADN avec un Kd mesuré par differentes techniques aux alentours de 10<sup>-9</sup> M. Des variations sont observées sur les mesures de Kd dans les différentes études

en fonction des techniques et des substrats d'ADN utilisés (198)(205)(206). Ku se lie aux extrémités d'ADN linéaires libres indépendamment de leur séquence et de leur configuration qu'elles soient franches ou ayant une extrémité 3' ou 5' sortante (207)(208)(209)(198)(210). En outre, Ku se lie à d'autres structures d'acides nucléiques, telles que les structures en épingle à cheveux (hairpin) (206)(211)(212). Cette protéine recouvre 20 à 35 pb comme le montre les expériences de footprinting (DNAase I) (207)(208). Cependant, elle peut former un complexe stable avec des fragments d'ADN entre 14 et 18 pb comme le montre les essais sur gel retard (198). La fixation de Ku ne se limite pas à un seul hétérodimère puisque plusieurs protéines peuvent être chargées dans des expériences *in vitro*. Ces observations supposent une translation ou un glissement du premier hétérodimère préalablement fixé (210)(213)(209).

Après fixation sur l'ADN, Ku protège l'ADN de l'action des nucléases incluant celles impliquées dans la résection des extrémités des CDBs et l'initiation de la RH. Il a été montré que la présence de Ku inhibe la résection par l'exonucléase Exo1 (214). L'absence de Ku dans les cellules induit une augmentation de la résection d'ADN alors que sa surexpression la réduit (215)(216).

En plus de son activité de protection des extrémités, Ku joue le rôle de plateforme de recrutement des autres partenaires du NHEJ. Chez les vertébrés, après fixation aux CDBs, Ku via le domaine C-ter de Ku80 recrute DNA-PKcs et forme une holoenzyme active DNA-PK, cette interaction est essentielle pour l'activité kinase de DNA-PK (217)(218). L'utilisation d'extraits nucléaires de cellules humaines mutées pour Ku (Ku80 dépourvue de la partie C-ter) indique une absence de stimulation de l'activité kinase de DNA-PK (219)(220). De plus, l'introduction dans les cellules xrs6 (dépourvue de Ku80) d'un mutant Ku (Ku80 dépourvue du domaine C-ter) ne restaure pas l'activité kinase de DNA-PK ni la résistance des cellules aux RI attendue pour des cellules sauvages (221). Autre que DNA-PKcs, Ku est impliqué dans le recrutement des protéines de maturation des extrémités incluant WRN et APLF. Ces deux protéines ont en commun des motifs polypeptidiques KBM (Ku Binding Motif) qui permettent l'interaction avec l'hétérodimère Ku. Le motif KBM a été caractérisé pour la première fois dans APLF (222). Deux motifs KBM-APLFlike ou A-KBM ont ensuite été retrouvés dans la protéine WRN. Ces A-KBM interagissent avec la sous unité Ku80 de Ku (223). L'affinité d'interaction entre APLF ou WRN et l'hétérodimère Ku70/Ku80 est modérée avec un Kd de l'ordre du 0,2 µM et 1 µM respectivement pour les motifs deet WRN à partir des essais de polarisation de fluorescence en utilisant un hétérodimère Ku dépourvu du domaine Cter de Ku80 et les motifs KBM de chaque protéine (224)(144). L'interaction de Ku avec ces deux protéines facilite leurs recrutements in cellulo au niveau des cassures de l'ADN introduites par microirradiation. APLF et WRN forment un complexe stable avec l'ADN double brin uniquement en présence de Ku comme le montrent des essais en gel retard (223)(225). Ku recrute également les partenaires du complexe de ligation. Deux protéines du complexe de ligation XLF et PAXX interagissent directement avec Ku via deux motifs KBM différents qui sont distincts en séquence du motif A-KBM d'APLF. Contrairement à APLF et WRN, l'interaction de XLF et PAXX avec Ku est dépendante de la présence d'ADN (226)(227). L'affinité de PAXX avec le complexe ADN-Ku n'est pas clairement établie, le Kd obtenue entre PAXX et le complexe ADN-Ku varie en fonction de la technique utilisée pour sa mesure et la taille de l'ADN. Ainsi lors de l'analyse par titration calorimétrique isotherme (ITC : Isothermal Titration Calorimetry) et en utilisant un ADN de 42 pb on obtient un Kd de 4µM (226) alors que l'analyse par la résonnance plasmonique de surface (SPR : Surface Plasmon Resonance) et en utilisant un ADN de 107 pb donne un Kd de 14,5 nM (8). Dans les cellules, l'analyse en microscopie à fluorescence du recrutement de XLF montre que la suppression des acides aminés codant pour le motif KBM empêche l'accumulation de XLF au niveau des CDBs induites par le laser (228). Comme pour XLF, l'accumulation de XRCC4-Ligase IV au niveau des CDBs dépend principalement de la présence de Ku70/Ku80 comme le montre l'étude de la cinétique de recrutement des partenaires du NHEJ au niveau des CDBs radio-induites dans les cellules de hamster chinois (203). Cependant, l'implication de XRCC4 ou Ligase IV dans cette interaction et l'affinité de ces interactions ne sont pas clairement établies. En combinant plusieurs approches incluant la mutagenèse dirigée, la Co-Immuno Précpitation (Co-IP) à partir d'extraits nucléaires de cellules Hela ou en utilisant des protéines purifiées et l'analyse par western-blot, il a été proposé que l'hétérodimère Ku interagirait avec Ligase IV (les résidus 644-748). Cette interaction est faiblement détéctée et elle dépend de la présence d'ADN (229)(230). Le développement d'une méthode de pontage (photo-cross-linking) et de transfert de marquage combinée à la technique de Co-IP et de western-blot a permis de caractériser une interaction potentielle de Ku avec XRCC4. Dans cette approche Ku est marqué avec un agent de pontage (Sulfo-SBED) qui contient un groupement ester sulfo-NHS (qui peut former une liaison covalente avec les résidus lysines), un groupement arylazide (qui peut être photo activé) et une biotine. Les essais sont effectués en utilisant soit des extraits nucléaires des cellules Hela soit XRCC4 purifié (203). Une étape importante pour établir la validité de ces deux interactions, Ku-(LigaseIV-XRCC4) et Ku-XRCC4, serait la caractérisation de mutants de séparation de fonction de Ku, XRCC4 ou Ligase IV ne présentant plus d'interactions ou des mesures quantitatives d'interactions. Les essais sur gel retard montrent que XRCC4-Ligase IV et XLF forment des complexes stables avec des fragments d'ADN inférieur à 100 pb uniquement en présence de Ku (231)(227). La nécessité de la présence de Ku sur l'ADN pour le recrutement des partenaires du complexe de ligation ainsi que la nature des interactions protéine-protéine impliquées sont au centre de nombreuses études et discussions, alors que d'autres études montrent que dans certaines conditions XRCC4 et XLF forment un complexe avec l'ADN en absence de Ku (232)(233).

Ku est suggéré comme étant impliquée dans le maintien des extrémités d'ADN proches en vue de la légation, activité appelée synapse (10)(234). Cette fonction de Ku n'a jamais été clairement confirmée, voire même a été réfutée.

Après l'étape de ligation, l'hétérodimère Ku est bloqué sur l'ADN, l'élimination de Ku nécessite l'implication de l'E3-ubiquitine ligase RNF8 (235)(236). La sous unité Ku80 du complexe ADN-Ku est poly-ubiquitinylé au niveau de la Lys48 (K48-polyUb) et cette poly-ubiquitylation est nécessaire pour la dissociation de Ku80 de l'ADN (237).

#### a2- La protection des télomères par l'hétérodimère Ku70/Ku80

Ku est aussi présent et joue un rôle dans la maintenance des télomères, extrémités des chromosomes de nombreuses espèces eucaryotes (238)(239). Ku se lie à l'ADN télomérique directement (240)(241) ou en interaction avec les protéines TRF1, TRF2 qui sont liées aux séquences répétées télomèriques (242)(243). La réduction des niveaux de Ku80 dans les lignées de cellules tumorales humaines conduit au raccourcissement et à la fusion des télomères (244)(245).

#### a3- Ku70/Ku80 dans la transcription

Initialement Ku a été décrit comme un facteur de transcription capable de se lier directement aux promoteurs et de réguler l'expression de certains gènes (246)(247)(248). Des études montrent que l'action de Ku sur la transcription se fait indirectement en agissant sur l'activité de l'ARN polymérase RNAPII (ARN polymérase II)(249). Ku interagirait avec la forme hyperphosphorylée de la RNAPII (RNAPIIO) engagée dans l'élongation de la transcription, mais pas avec la forme hypophosphorylée présente en phase d'initiation de transcription (RNAPIIA)(250).

#### b- La structure de l'hétérodimère Ku70/Ku80

Les deux sous-unités de l'hétérodimère Ku70/Ku80 présentent 3 domaines conservés : un domaine N terminal constitué d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  appelé domaine vWA (*von Willebrand A*)) ; un domaine central ("*Ku core*") et un domaine C-ter en hélice  $\alpha$ . Le domaine vWA est présent dans la plupart des protéines de la matrice extracellulaire mais aussi dans plusieurs protéines intracellulaires. Ce type de domaine est impliqué dans des interactions protéine-protéine (251)(252). Chacune des sous-unités contient un domaine de localisation nucléaire NLS (*Nuclear Localisation Signal*) dans la partie C-ter (202). La sous-unité Ku70 contient aussi un domaine potentiel d'interaction avec l'ADN nommé domaine SAP (*SAF-A/B, Acinus and PIAS*) au niveau de la partie C-ter. Ce domaine augmente l'affinité de l'hétérodimère pour l'ADN (253)(254)(figure 8).



*Figure 8: Les domaines protéiques de l'hétérodimère Ku70/Ku80* Chaque sous-unité contient un domaine vWA, un domaine Ku core, un domaine C<sub>ter</sub> et un signal de localisation nucléaire NLS. La partie C<sub>ter</sub> de Ku70 contient un domaine SAP essentiel pour l'interaction avec l'ADN.

La structure cristallographique d'une forme tronquée de l'hétérodimère Ku70/Ku80 où Ku80 est dépourvu du domaine  $C_{ter}$ , seul ou en complexe avec l'ADN a été déterminé par John R. Walker et ses collaborateurs en 2001 (255). Les deux sous-unités (Ku70 et Ku80) forment via leur domaine central appelé «*Ku core* » une structure en anneau, capable de reconnaître au minimum 14 pb d'ADN. Le centre de l'anneau est constitué d'une surface chargée positivement qui interagit avec le squelette sucre-phosphate permettant ainsi à l'hétérodimère Ku70/Ku80 d'interagir avec l'ADN indépendamment de sa séquence (255). Le domaine SAP qui était situé à proximité de la structure en anneau en présence d'ADN (255)(figure 9), n'est plus visible dans les cartes de densité électronique suggérant qu'il s'est déplacé et qu'il est mobile dans le cristal.


*Figure 9: Structure cristallographique de l'hétérodimère Ku70/Ku80 humain* a- La structure de l'hétérodimère Ku70/Ku80 seul (en violet la sous unité ku70 et en vert la sous unité Ku80). B- La structure du complexe Ku70/Ku80-ADN Figure adaptée de Ochi,T *et al.*, (256). c- La structure secondaire de l'ADN utilisé pour la cristallisation (ADN contenant une structure en épingle à cheveux). Figure adaptée de Walker,J.R *et al.* (255).

Une étude en MET (coloration négative) de Ku70/Ku80<sub>FL</sub> seul ou en complexe avec l'ADN ainsi que du complexe DNA-PK (ADN-Ku-DNA-PKcs) a permis d'obtenir une reconstruction tridimensionnelle à basse résolution (25 Å) de la protéine entière. La cartographie de la région C-ter des deux sous-unités montre aussi un déplacement du domaine SAP à proximité de la structure en anneau en présence d'ADN comme ce qui a été décrit dans la structure cristallographique. En outre, le domaine C-terminal de la sous-unité Ku80 subit un déplacement substantiel uniquement lorsque la DNA-PKcs est recrutée. Il se détache du domaine core pour interagir avec la DNA-PKcs (257). Un changement de conformation dans le domaine C-ter des sous-unités Ku70 et Ku80 a ét é mis en évidence en combinant les données de protéolyse ménagée et l'analyse par spectrométrie de masse (Ku biotinylé seul ou en complexe avec l'ADN) (258). Récemment, la structure cryoEM de Ku-DNA-PKcs permis d'obtenir une reconstruction à 6,6 Å (259).

## III-2- DNA-PKcs (DNA-Protein kinase catalytic subunit)

DNA-PKcs est une protéine de 469 KDa avec 4128 acides aminés, membre de la famille PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) qui inclus aussi ATM et ATR (Rad3- related protein) (260)(261). Des homologues de DNA-PKcs ont été identifiés dans tous les vertébrés examinés mais aucun équivalent n'a été découvert chez certains eucaryotes tels que *Saccharomyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans* ou *Drosophila* (15)(16). Les souris dépourvues de DNA-PKcs sont viables mais présentent le phénotype SCID (*severe combined immunodeficiency*) (262)(263)(264). Les cellules humaines dépourvues de DNA-PKcs présentent une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et un défaut dans la réparation des CDBs (265). Chez l'homme une mutation non-sens de DNA-PKcs est associée au phénotype RS-SCID (RadioSensitive Severe Combined Immuno Deficiency), cette mutation n'affecte pas l'activité kinase de DNA-PK mais inhibe l'activité d'Artémis (266).

### a- La fonction de DNA-PKcs

La sous-unité catalytique de DNA-PK (DNA-PKcs) interagit avec le complexe ADN-Ku et forme une holoenzyme active DNA-PK. Des essais de photo-crosslinking montrent que la fixation de DNA-PKcs au complexe ADN-Ku entraine une translocation de Ku vers l'intérieur. DNA-PKcs se fixe à environ 10 pb et se positionne à l'extrémité de l'ADN bloquant ainsi l'accès aux autres partenaires du NHEJ (135). Cette enzyme phosphoryle préférentiellement les sérines ou les thréonines suivies par une glutamine (267)(268). Même si de nombreux substrats de DNA-PK sont caractérisés incluant Ku70/80 (268), DNA-PK elle même (269)(270), XRCC4 (271)(272)(273)(274), XLF (275), DNA Ligase IV (276) et WRN (277), l'importance de l'activité kinase de DNA-PK dans la réparation par la voie NHEJ est en cours de caractérisation. La phosphorylation d'un grand nombre de ces substrats ne semble pas importante pour la réparation des CDBs in vivo (275)(276)(271) à l'exception de DNA-PK elle même (278). Son autophosphorylation induit l'inhibition de l'activité kinase de DNA-PK (279)(280). L'analyse des données en SAXS montre que l'autophosphorylation de DNA-PK provoque un changement de conformation (136)(12) et une dissociation de DNA-PKcs des extrémités permettant aux autres partenaires du NHEJ d'accéder aux extrémités de l'ADN (13)(136)(137)(138). L'autophosphorylation de DNA-PKcs au niveau du cluster T2609-T2647 est aussi nécessaire pour l'activité endonucléase d'Artémis et la mise en place de la recombinaison V(D)J (281)(282). De nombreuses études ont porté sur l'impact de la phosphorylation médiée par la DNA-PKcs sur la fonction de XRCC4. Dans les cellules, XRCC4 est phosphorylé par DNA-PK en réponse aux traitements par RI ou par un agent inducteur de CDBs (283)(284). Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés incluant Ser 260 et Ser 320 (272)(285). Cependant, l'introduction des mutants XRCC4 dépourvus de ces sites de phosphorylation permet de restaurer la radiorésistance aux RI et la recombinaison V (D) J dans les cellules XR-1 dépourvues de XRCC4 (271)(272)(285).

En dehors de sa fonction Kinase, DNA-PK peut avoir un rôle structurant lors de la réparation des CDBs par la voie NHEJ. Les deux holoenzymes DNA-PK fixées de part et d'autre de la cassure double brin peuvent interagir et former une synapse (286)(13). L'analyse des données SAXS montre que DNA-PKcs forme un dimère en solution, des

dimères sont formés aussi en présence d'ADN et de Ku (12). Une dimérisation de DNA-PKcs est aussi observée dans la structure 3D du complexe ADN-DNA-PKcs-Ku (13). Cette synapse permettrait le rapprochement des deux extrémités d'ADN durant la réparation, évitant ainsi les remaniements génétiques et limitant la dégradation des extrémités par les nucléases (107). Contrairement à Ku, DNA-PKcs n'est pas toujours impliquée dans la réparation des CDBs (287).

En partant du principe que les CDBs réparées rapidement dans la cellule sont des CDBs simples et que les CDBs réparées tardivement sont des CDBs complexes. L'analyse en temps réel de la réparation des CDBs dans la cellule montre que les CDBs simples sont réparées rapidement en présence de Ku, XRCC4-Ligase IV et XLF. En revanche, les CDBs complexes sont réparées lentement et impliquent non seulement Ku, XRCC4, Ligase IV, XLF mais aussi DNA-PKcs (14).

b- La structure de DNA-PKcs

Le domaine N terminal de DNA-PKcs est composé de 66 répétitions de type HEAT (Hungtingtin, elongation factor3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1). La région C-terminale contient un domaine FAT (FRAP, ATM, TRRAP), un domaine kinase PIKK et un domaine FATC (FAT C-terminal) (figure 10).



Figure 10 : Les domaines protéiques de DNA-PKcs

Le domaine N-ter composé de répétition de motifs HEAT s'étend du 1<sup>er</sup> au 2908<sup>eme</sup> acide aminé. Le domaine C-terminal constitué d'un domaine FAT, PIKK et FATC. En rouge les principaux sites de phosphorylation. Les résidus impliqués dans l'interaction avec Ku au niveau e l'extrémité du domaine C-ter sont indiqués en rouge. Figure adaptée de Mahaney, B.L. *et al.* (107).

En raison de sa taille, la cristallisation de DNA-PKcs seul ou en complexe avec ses partenaires s'est révélée difficile. Les études en Cryo-EM de DNA-PKcs montrent que les motifs HEAT forment une structure circulaire creuse, le domaine Kinase en C-ter est situé au sommet de cette structure (288)(289). Vu de profil, cet anneau a une forme de berceau avec une ouverture à proximité du domaine N-ter de la protéine. A l'intérieur de cette partie circulaire, se trouve un domaine globulaire de liaison à l'ADN (290) (figure 11). Le domaine  $C_{ter}$  de DNA-PKcs permet l'interaction avec d'autres protéines incluant l'hétérodimère Ku70/Ku80 (291). Une structure cristallographique de DNA-PKcs en complexe avec la partie C-ter de Ku80 est obtenue avec une résolution de 6,6 Å. Les nombreuses répétitions HEAT hélicoïdales (motifs hélice-tourne-hélice) facilitent la flexion et permettent à la chaîne polypeptidique de se replier dans une structure circulaire creuse. Le domaine kinase C-terminal est situé au-dessus de cette structure et un petit domaine répétitif HEAT qui lie probablement l'ADN est à l'intérieur (292).



#### Figure 11: Structure de DNA-PKcs

Les vues de face et de profil avec des flèches bleues indiquent les sites flexibles, la structure circulaire en vert, le domaine putatif de liaison à l'ADN en violet.Les domaines FAT et FATC sont en rouge et le domaine kinase en jaune. Figures adaptée de Ochi, T *et al.* (256).

# III-3- Les protéines impliquées dans la maturation des extrémités

Les protéines de maturation appartiennent à plusieurs classes d'enzymes parmi lesquelles figurent notamment des nucléases ((Artémis), WRN, APLF (*Aprataxin and PNK-like factor*)), l'hélicase Werner (WRN), des nucléotides kinases/phosphatases (PNK) et les ADN polymérases (polλ, pol μ, TdT,...).

### al-La nucléase Artémis

Artémis est une nucléase de la superfamille des metallo-*β*-lactamases qui présentent une activité exonucléase  $5' \rightarrow 3'$  sur des extrémités 5' sortantes et une activité endonucléase restreinte à certaines structures d'ADN comme les Hairpin. C'est une protéine de 692 acides aminés avec une masse d'environ 78 kDa. Le domaine N-terminal est composé d'un domaine métallo-\beta-lactamase et d'un domaine \beta-CASP (metallo-\beta-lactamases-associated CPSF ARTEMIS SNM1 PSO2) important pour son activité enzymatique. Un résidu histidine 254 localisé dans le domaine  $\beta$ -CASP, a récemment été identifié pour son rôle critique dans son activité catalytique. Le domaine C-terminal (385-692 aa) qui constitue la moitié de la protéine est impliqué dans l'interaction avec d'autres protéines incluant DNA-PKcs et Ligase IV (293)(294). L'interaction d'Artémis avec DNA-PK phosphorylé permet son recrutement au niveau des CDBs et l'activation de son activité endonucléase spécifique des extrémités 5' et 3' sortantes et des structures en hairpin. Cette activité est nécessaire au clivage des structures en épingle à cheveux durant la recombinaison V(D)J (139)(281)(295). Artémis est aussi impliqué dans la réparation d'environ 10-15% des CDBs accidentelles (296). Des mutations dans le gène ARTEMIS ont été identifiées chez des patients RS-SCID qui présentent un défaut dans la recombinaison V(D)J et un défaut dans la réparation des CDBs via la voie NHEJ (140)(297)(298).

## a2- La nucléase APLF (Aprataxin and PNK-like factor)

APLF porte une activité endonucléase et exonucléase  $3^{\circ} \rightarrow 5^{\circ}$  et une diminution de l'expression d'APLF conduit à un défaut de réparation des CDBs (225). Elle stimule la ligation par XRCC4-Ligase IV seulement en présence de Ku70/Ku80 (144). APLF est composé d'un domaine FHA au niveau de la région N-terminale, de deux domaines PBZ (poly (ADP-ribose)-binding zinc finger) et d'un motif NAP1L (nucleosome assembly protein 1 like) dans la partie C-ter. Ces domaines sont impliqués dans son interaction avec d'autres protéines de la voie NHEJ. Ainsi, le domaine FHA permet l'interaction avec XRCC4 précédemment phosphorylé par la kinase CK2 (143)(225), le domaine centrale MID (182-191) interagit directement avec le domaine vWA de Ku80 (144)(222). De plus, cette protéine possède un motif semblable aux protéines d'assemblage de nucléosome de type NAP1L (nucleosome assembly protein 1 like) (299) dont la fonction au cours du NHEJ n'est pas établie.

### a3- L'hélicase nucléase WRN (Werner)

WRN est une protéine de 1432 aa, membre de la famille des RecQ hélicases. Elle a une activité hélicase et une activité exonucléase  $3^{\prime} \rightarrow 5$  (148). Des mutations dans le gène *WRN* sont associées au Syndrome de Werner, une maladie héréditaire caractérisée par un vieillissement prématuré lié à un défaut de maintien des télomères, une instabilité génétique et une prédisposition aux cancers (300)(301). La protéine est composée d'un domaine exonucléase dans la région N-terminale suivi d'un domaine hélicase, d'un domaine RQC (RecQcarboxyl terminal) et d'un domaine HRDC (helicase and RNase D C-ter) (302). WRN interagit avec l'hétérodimère Ku70/Ku80, cette interaction stimule son activité exonucléase (303). L'interaction de WRN avec Ku implique les domaines N et C-terminaux portant chacun un domaine KBM (223). La partie C-ter de WRN peut interagir avec Ku80 alors que sa partie N-terminale interagirait avec Ku70. Seule l'interaction avec Ku70 est nécessaire pour la stimulation de l'activité exonucléase de WRN (223). WRN interagit également avec le complexe XRCC4/ Ligase IV, ce qui stimule aussi son activité exonucléase (304). Les activités exonucléase et hélicases de WRN sont inhibées suite à sa phosphorylation par DNA-PK (305).

### b- La PNK (PolyNucleotide Kinase)

La polynucleotide kinase / phosphatase de mammifères (PNKP) contient des activités 3'phosphatase et 5'-kinase présentes dans deux sites actifs distincts. L'enzyme est constituée d'un domaine N-terminal FHA (Forkhead-associated domain) qui permet l'interaction avec des phosphoprotéines, un domaine C-ter contenant les activités phosphatase et kinase (306). L'activité phosphatase permet l'hydrolyse des extrémités 3' phosphorylées (3'-P) et l'activité kinase permet de phosphoryler les extrémités 5' hydroxyles (5'-OH) (307). L'implication de PNK dans divers processus de réparation de l'ADN est soulignée par le fait que la diminution du taux de PNK suite au traitement des cellules par un ARN interférant conduit à une sensibilisation aux agents génotoxiques. Par ailleurs, un défaut d'expression de la PNK conduit à une radiosensibilité accrue ainsi qu'à une perte partielle de réparation des CDBs (308). PNK interagit avec XRCC4 phosphorylé par CK2 (Caseine Kinase 2), via son domaine FHA situé en N-terminal (309)(310) et cette interaction est essentielle pour la réparation des CDBs dans la cellule (311).

### c- Les ADN polymérases: TdT, pol $\mu$ , pol $\lambda$ et pol $\beta$

Les ADN polymérases  $\mu$ ,  $\lambda$  et  $\beta$  ainsi que la TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*)

sont des polymérases de la famille X. Ces ADN polymérases sont impliquées dans la réparation par excision de base (BER), la réparation des CDBs par la voie NHEJ ainsi que dans la recombinaison V(D)J (150). Elles possèdent des similarités structurales, mais des propriétés biochimiques différentes. Les Pol µ et TdT sont capables de catalyser la synthèse d'ADN en absence de matrice. La Pol ß remplit des lacunes de nucléotides au cours de la réparation plutôt dans la voie BER (312)(313). Aucune de ces enzymes ne possède une fonction de correction (proofreading) et leur fidélité intrinsèque est plus faible que celle des polymérases réplicatives (314). Bien qu'elles ne présentent pas de grandes homologies de séquence, les structures globales des domaines enzymatiques sont similaires (315) (316)(317). Elles possèdent un domaine BRCT (BRCA1 C Terminus) en N-terminal ainsi qu'un domaine catalytique en C-terminal. Le domaine N-terminal est aussi impliqué dans l'interaction avec d'autres partenaires du NHEJ tels que Ku70/Ku80, XRCC4 et la Ligase IV. Pol µ interagit avec Ku70/Ku80, et la présence de XRCC4 et de Ligase IV est requise pour son recrutement aux extrémités des CDBs et son activité de synthèse d'ADN (318). TdT interagit avec Ku et XRCC4 et cette interaction est importante au cours de la recombinaison V(D)J (319). Pol  $\lambda$  se lie aux CDBs en présence du complexe XRCC4/Ligase IV et en absence de Ku (320).

## III-4- Les partenaires du complexe de ligation

Le complexe de ligation est un complexe multiprotéique qui comporte la Ligase IV, XRCC4, XLF et PAXX. La Ligase IV, dans le complexe avec XRCC4 et XLF, est indispensable à la réaction de ligation du NHEJ et chez l'homme l'absence d'un de ces facteurs entraîne un défaut dans la réparation des CDBs et une immunodéficience (321)(322)(323).

## a- Ligase IV

Ligase IV est un membre de la famille des ligases ATP dépendantes qui inclut la ligase I et la ligase III. Des homologues de Ligase IV existent dans tous les organismes eucaryotes allant des levures à l'homme (156). C'est une nucléotidyltransférase qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre deux extrémités 3' OH et 5'P d'ADN. Au cours de la ligation, un intermédiaire covalent AMP-lysine est formé avec la lysine catalytique (K273) dans le motif I de Ligase IV (étape 1) (adénylation), l'AMP est ensuite transféré au phosphate 5' du brin d'ADN (étape 2). Le nick est ensuite scellé par la

formation d'une liaison phosphodiester (étape3) (324). Contrairement aux autres ligases, la Ligase IV purifiée à partir des cellules en culture est adénylée (325).

## al-La fonction de Ligase IV

La Ligase IV est impliquée dans la dernière étape de la réparation par la voie NHEJ et la recombinaison V(D)J à savoir la ligation des extrémités (326). La Ligase IV restaure la liaison phosphodiester entre les extrémités 5'P et 3'OH (327).

L'inactivation du gène LIG4 chez les souris entraîne une létalité embryonnaire tardive (321)(328). Chez l'homme le gène LIG4 code pour une protéine de 911 acides aminés (103971 kDa) (329). Les patients ayant des mutations dans ce gène présentent des symptômes cliniques diversifiés, notamment des caractéristiques faciales distinctives, une microcéphalie, des anomalies cutanées, des problèmes de croissance et de développement et une immunodéficience (330)(331)(332).

### a2- La structure de la Ligase IV

La Ligase IV possède un domaine de liaison à l'ADN (DBD (DNA Binding Domain)) dans la région N-terminale ainsi qu'un domaine catalytique, lui-même composé d'un domaine NTase (*NucleotidylTransferase*) et d'un domaine OBD (*OB-folddomain*). Elle possède aussi deux domaines BRCT (*BRCA1 C Terminus*) répétés en tandem en position C-ter séparés par un poly-peptide XIR (*XRCC4 Interacting Region*) (LigIV<sub>755-782</sub>) (333) (figure 12a). Le domaine XIR permet l'interaction de la Ligase IV avec XRCC4 (334). A ce jour il n'existe pas de structure cristallographique de la protéine entière. On trouve uniquement la structure de certains domaines de la Ligase IV en complexe avec d'autres protéines :

- les domaines BRCT avec XRCC4 (335),
- le domaine DBD avec un peptide d'Artémis (336),
- le domaine catalytique (1-609) avec un peptide d'Artémis (485-495)(337).

Les cinq premiers résidus, les deux boucles (résidus 58-59 et 115-123) et les trois derniers résidus de LigIV1-609 sont désordonnés dans les cristaux. Le domaine DBD comporte plusieurs motifs hélice-tour-hélice qui s'insèrent dans le petit sillon de l'ADN (337).





a- Représentation schématique des domaines protéiques de la Ligase IV, b-Structure cristallographique de la Ligase IV dépourvue du domaine  $C_{ter}$  (1-609) en complexe avec un peptide d'Artémis , les pointillés présentent la partie manquante, c-vue à 90°C du complexe. Figure adaptée de Ochi, T. *et al.* (337).

### b- XRCC4 (X-Ray-sensitive Cross-Complementing group 4)

XRCC4 (X-Ray-sensitive Cross-Complementing group 4) est une protéine de 336 acides aminés (38 kDa) (338). Des homologues de XRCC4 sont retrouvés dans tous les organismes eucaryotes allant des levures à l'homme (339)(340)(341).

## b1-Les fonctions de XRCC4

XRCC4 ne présente aucune activité enzymatique, initialement cette protéine a été définie comme un partenaire polyvalent de la Ligase IV (342) essentiel pour la réparation par la voie NHEJ et la recombinaison V(D)J. Les cellules humaines contiennent plus de XRCC4

que de Ligase IV, ce qui suggère que XRCC4 exerce d'autres fonctions indépendamment de son partenariat avec la Ligase IV (343).

Les souris KO pour XRCC4 meurent au stade embryonnaire en raison d'une apoptose massive des neurones post-mitotiques (344). Chez l'homme, les mutations de XRCC4 causent un défaut de croissance postnatal, une microcéphalie, une insuffisance gonadique, un syndrome métabolique (syndrome X) et éventuellement une prédisposition à différents types de cancer (345)(346)(347)(348)(349). Les cellules qui présentent un défaut dans l'expression de la protéine XRCC4 sont hypersensibles aux radiations ionisantes et présentent un défaut dans la recombinaison V(D)J (341). En combinant des approches biochimiques (gel filtration, un essai d'adénylation, chromatographie d'affinité) et les données de co-immunoprécpitation (Co-IP), il a été monté que XRCC4 forme un complexe stable avec la Ligase IV même en présence de 1M de NaCl (274). XRCC4 stimule l'activité de la Ligase IV en stimulant son adénylation in vitro (274)(338)(232). In vivo, XRCC4 est essentielle pour la stabilité de la Ligase IV. Ainsi dans les cellules XR-1 dépourvues de XRCC4, le taux de la protéine Ligase IV chute drastiquement alors que le niveau des ARNm qui code pour cette protéine ne varie pas (342). XRCC4 phosphorylée par la kinase CK2 (Casein Kinase 2) interagit avec le domaine FHA (forkhead associated) des enzymes de maturation incluant APLF, PNKP et APTX. Ces interactions sont requises pour une réparation optimale des CDBs in vivo (225)(311)(350)(351)(352). Le mécanisme de recrutement de XRCC4 au niveau des CDBs est toujours en cours de discussion. In vitro, XRCC4 interagit faiblement avec l'ADN, les essais de gel retard montrent que XRCC4 forme un complexe stable avec l'ADN à des concentrations en protéine de l'ordre du µM et en utilisant des fragments d'ADN d'une taille supérieure à 200 pb (232). Le mécanisme d'interaction de XRCC4 avec l'ADN n'est pas clairement établi, cette protéine ne présente aucun domaine d'interaction à l'ADN. Les essais de gel retard montrent que plusieurs parties de la protéine sont nécessaires pour la liaison avec l'ADN incluant le peptide (1-28 aa) du domaine N terminal et le peptide (168-200 aa) du domaine central. Le domaine C-ter (201-336 aa) n'est pas indispensable pour l'interaction avec l'ADN mais lorsqu'il est présent, il renforce cette dernière (232). Dans les cellules après irradiation, XRCC4 s'associe à la chromatine et l'analyse par fractionnement biochimique des cellules irradiées montre qu'environ 1% des molécules XRCC4 se lie à la chromatine (353). L'interaction de XRCC4 avec l'ADN ne serait pas nécessaire pour stimuler l'activité de Ligase IV, cependant la mutation des domaines impliqués dans l'interaction avec l'ADN affecte la recombinaison V(D)J (232). Ces résultats suggèrent une fonction de XRCC4 indépendante de Ligase IV.

### *b2- La structure de XRCC4*

XRCC4 est composée d'une tête globulaire N-terminale (acides aminés 1-115 aa), suivie d'une tige en hélice- $\alpha$  (domaine Coiled-Coil) (115-203 aa) et d'un domaine C-terminal proposé comme non structuré (203-336 aa) (figure 10 b). La présence d'un domaine C-ter non structuré rend l'obtention de la structure cristallographique de XRCC4 entière difficile. A ce jour, seule la structure cristallographique d'une forme tronquée de XRCC4<sub>203</sub> (1-203 aa)(354) a été obtenue. L'unité asymétrique du cristal est constituée d'un dimère de XRCC4, chaque monomère contient un domaine tête globulaire et des domaines tiges de taille différente (la sous unité L (119-203) d'un monomère et la sous unité S (119-178) pour le deuxième monomère) (354). L'homodimère XRCC4 est stabilisé par des interactions au niveau des résidus 119-155 et un pont disulfure entre les résidus C130 de chaque monomère (figure 13 a) (354). Même si la structure cristallographique du domaine C-terminal de XRCC4 n'est pas déterminée, l'analyse des données SAXS de XRCC4<sub>FL</sub> montre que le domaine C-ter non structuré se replie sur lui même (355) (figure 13 b).



#### Figure 13: Structure de XRCC4

a-Structure cristallographique d'un dimère de XRCC4<sub>203</sub>, la sous-unité L en vert foncé, la sous unité S (1-178) en vert claire. Figure adaptée de Junop M.S. *et al.*(354). b1- Les domaines de la protéine XRCC4,. Le domaine d'interaction avec Ligase IV est souligné par un trait. b2- Représentation d'un dimère de XRCC4 avec le domaine tête (orange), le domaine tige (vert), la position du domaine CTR non structuré à partir des donnés SAXS. Les sites phosphorylés par DNA-PK en rouge. Figure adaptée de Mahney BL. *et al.* (355).

Autre que l'assemblage en dimère, l'analyse de la structure cristallographique de  $XRCC4_{203}$ , montre que les dimères de  $XRCC4_{203}$  interagissent via le domaine d'interaction avec la Ligase IV et forme un tétramère (354) (figure14 a). Une organisation en tétramère est aussi suggérée pour  $XRCC4_{FL}$  en se basant sur les données obtenues en SAXS. Cependant dans ce cas les dimères de  $XRCC4_{FL}$  interagissent via le domaine N terminal et cette interaction est renforcée par le domaine  $C_{ter}$  qui se plie sur lui-même (356) (figure 14 b1, b2). L'analyse des données SAXS suggèrent qu'en solution différents états oligomériques (dimères et tétramères) de  $XRCC4_{FL}$  coexistent en différentes proportions (356) (figure 14 b2).



Figure 14: L'assemblage en tétramère de XRCC4.

a- Structure cristallographique d'un tétramère de XRCC4<sub>1-203</sub> -a1, a2 : Deux vues orthogonales d'un tétramère XRCC4<sub>203</sub>. a3: Domaines impliqués dans la tétramérisation de XRCC4. a5 : Les hélices alpha des dimères se déroulent de manière antiparallèle l'une sur l'autre et forment un faisceau anti-parallèle à quatre hélices entre les résidus 159 et 173 (cadre bleu claire). a4 : la sous-unité S désordonnée après le résidu 178, l'interface d'interaction entre deux dimères est constituée de trois hélices avec des résidus 180-203 d'une sous-unité L et des résidus 140-163 du dimère opposé (cadre bleu foncé). Figure adaptée de Murray S Junop *et al.*(354). b: Assemblages XRCC4<sub>FL</sub> en solution, b1 : Enveloppes moyennes obtenues à partir des données SAXS de XRCC4<sub>FL</sub> en solution, b2 : Modèles atomique pour les dimères de XRCC4 (en jaune), les tétramères de XRCC4 (jaune et rouge) qui interagissent via le domaine N terminal avec les porcentages associés. Figure adaptée de Michal Hammel *et al.* (356).

#### c- Le complexe XRCC4-Ligase IV

Ligase IV interagit avec XRCC4. Cette interaction est essentielle pour la stabilité de la Ligase IV et à la stimulation de son activité (274)(357)(342). La région XIR entre les domaines BRCT de la Ligase IV se lie au domaine Coiled-Coil de XRCC4. Le domaine XIR est nécessaire et suffisant pour l'interaction entre XRCC4 et la Ligase IV (334)(358). Cependant l'analyse fonctionnelle de l'interaction de XRCC4 avec la Ligase IV montre que le deuxième domaine BRCT de Ligase IV stabilise l'interaction *in vivo* (335). Le

rapport stœchiométrique du complexe XRCC4-Ligase IV est de 2 :1 comme le révèle les analyses biochimiques et la structure cristallographique(358) (359).

En présence de XRCC4, la ligase IV peut joindre les extrémités avec une microhomologie de 4pb en présence d'un gap de 1nt (360). Le complexe XRCC4/ligase IV peut aussi lier des CDBs avec des extrémités cohésives 3' et 5' sortantes, toute fois cette ligation dépend de la séquence d'ADN (361). Par ailleurs, le complexe interagit avec des enzymes de maturation incluant les polymérases de la famille X Pol  $\mu$  et Pol  $\lambda$ , la terminale transférase et l'hélicase WRN (304)(318)(362). Le complexe XRCC4/Ligase IV stimule aussi l'activité endonucléase d'Artémis uniquement au niveau des extrémités 3' sortantes indépendamment de DNA-PKcs (363).

### d- XLF (XRCC4-like-factor)

En 2006, deux équipes ont simultanément identifié un nouveau gène responsable de symptômes observés chez les patients RS-SCID en utilisant différentes approches expérimentales. L'équipe de Jean-Pierre de Villartay en utilisant la technique de complémentation fonctionnelle de fibroblastes de patients RS-SCID avec une banque d'ADNc humains a isolé un ADNc qui restaure les fonctions de réparation des CDBs et de recombinaison V(D)J. Cet ADNc code pour une protéine de 299 aa baptisée Cernunnos (364). En parallèle, la recherche de nouveaux partenaires de XRCC4 par la technique du double-hybride a permis d'identifier une protéine de 33 kDa nommée XRCC4-Like Factor (XLF) du fait d'une structure prédite similaire à celle de XRCC4 (155). XLF s'est avérée identique à Cernunnos. XLF est une protéine conservée chez les eucaryotes et des orthologues de XLF ont été retrouvés dans tous les organismes eucaryotes allant des levures à l'homme (365)(366)(367). Les patients ayant des mutations dans le gène XLF ont des microcéphalies, un retard de croissance, une lymphopénie progressive et sont radiosensibles et immuno-déficients (368)(114). En revanche, les souris déficientes en XLF sont immunocompétentes et n'ont aucun phénotype neurologique ou retard de croissance. De plus, les différents types de cellules de ces souris sont affectées différemment par les mutations de XLF (369)(370).

### *d1-La fonction de XLF*

Comme XLF interagit à la fois avec Ku et avec XRCC4, il a été suggéré que XLF était impliqué dans le recrutement de XRCC4-Ligase IV au niveau des CDBs via son interaction avec le complexe ADN-Ku. Cependant des essais *in vitro* de gel retard montrent que XRCC4-ligaseIV (X4L4) forme un complexe stable avec le complexe ADN-Ku en absence de XLF (231).

Dans les essais de ligation *in vitro*, il a été montré que XLF stimule uniquement la ligation de courtes extrémités incompatibles 3' sortantes en présence de Ku et XRCC4/Ligase IV (360). Cependant dans une autre étude il a été montré que XLF favorise la ligation de toutes les extrémités incompatibles et non cohésives en présence de Ku, DNA-PKcs et XRCC4-Ligase IV (371). Bien qu'il soit possible que DNA-PK module la fonction de XLF, il est également possible que ce soit la différence dans les substrats d'ADN utilisés dans chaque étude qui affecte les résultats. Dans les essais impliquant DNA-PKcs, les auteurs utilisent un substrat de 3 kb alors que dans les études n'impliquant pas la DNA-PKcs, les auteurs utilisent des fragments de 70 pb. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre la fonction de XLF au cours de la réparation par la voie NHEJ.

## d2- La structure de XLF

Les prédictions de la structure secondaire ont suggéré que XLF et XRCC4 présentent des homologies de structure malgré une faible similarité de séquence (155) (figure 15).



#### Figure 15: Structure de XLF

a-Structure cristallographique d'un monomère de XLF (1-233), b- Le diagramme topologique du prototype XLF, les éléments de structure secondaire sont de la même couleur que (A). Figure adaptée de Li, Y. *et al.* (372). c- Les principales régions de  $XLF_{FL}$ , le domaine tête en orange, le domaine Coiled-Coil en vert et le domaine C-ter en rose pale, les site de phosphorylation en rouge, d- la structure cristallographique de XLF avec la position prédite du domaine C-ter. Figure adaptée de Mahney BL. *et al.* (355).

XLF est composé d'une tête globulaire N-terminal (acides aminés 1-135 aa), suivie d'une tige en hélice- $\alpha$  (domaine Coiled-Coil) (135-224 aa) et d'un domaine C-terminal non structuré (224-299 aa). La structure cristallographique de XLF dépourvu de la partie C-Ter (1-233 aa) confirme la similarité structurale prédite avec XRCC4. Cependant le domaine Coiled-Coil est plus court que celui de XRCC4 et subit une inversion vers le haut. L'existence de XLF en dimère est confirmée par la chromatographie d'exclusion de taille, l'ultracentrifugation et la diffusion aux petits angles des rayons X (372).

### e- Le complexe XRCC4/XLF

Les différentes études de la structure cristallographique du complexe XRCC4-XLF avec des protéines tronquées (dépourvues de la partie C-ter) combinées à celles obtenues en MET montrent que le complexe XRCC4-XLF tronqué s'organise en longs filaments hélicoïdaux. Les filaments sont formés par la succession d'un dimère de XRCC4 tronqué et d'un dimère de XLF tronqué qui interagissent principalement par la partie N terminal. Des petits changements de conformation dans les domaines tête permettent à L115 de XLF de former un "verrou de leucine" qui s'insère dans une poche hydrophobe générée par M59, M61, F106 et L108 ainsi que K65 et K99 de XRCC4. En outre, R64 et L65 de XLF et R107, E55 et D58 de XRCC4 forment une interface d'interactions secondaires et complémentaires (17)(373) (374) (discuter dans les chapitres suivant). La mutation de XLF L115 supprime la liaison avec XRCC4 (373)(374)(375) et la mutation dans la poche hydrophobe de XRCC4 perturbe l'interaction avec XLF (17). L'interaction XLF-XRCC4 est fonctionnellement importante, car les mutants XLF-R64E, L65D et L115D qui n'interagissent pas avec le complexe XRCC4-LIG4 ne restaurent pas la recombinaison V(D)J dans les fibroblastes déficients en XLF (376).

De même, les mutants XRCC4 qui n'interagissent pas avec XLF ne restaurent pas la recombinaison V(D)J extra-chromosomiques dans des cellules CHO déficitaires en XRCC4 (XR-1)(377). En outre, les mutants XLF qui ne peuvent pas lier XRCC4 ne restaurent pas la résistance à la bléomycine des cellules déficitaires en XLF et les foyers  $\gamma$ -H2AX persistent dans ces cellules après exposition aux RI (376). De même, l'introduction d'un mutant XRCC4 qui étaient défectueux dans la liaison avec XLF ne restaure pas la résistance aux RI des cellules XR-1 ; la surexpression de ce mutant agit comme un dominant négatif (377). Les mutations de XLF (R57G et C123R) détectées chez les patients sont prédites pour déstabiliser les interactions XRCC4-XLF. Ces études révèlent

que l'interaction directe de XRCC4 et XLF est essentielle pour l'efficacité du NHEJ *in vivo* (376).

# IV- La microscopie IV-1- Le principe de la microscopie électronique

La microscopie électronique (ME) est développée sur la base des lois de l'optique mais contrairement à la microscopie optique, elle utilise un faisceau d'électrons accélérés et focalisés avec des lentilles électromagnétiques comme source d'illumination, au lieu de photons. Selon la théorie d'Abbe, la limite de résolution d'un microscope, c'est-à-dire la plus petite distance en dessous de laquelle deux points voisins ne seront plus distingués, est dépendante de la longueur d'onde d'illumination. Ainsi la limite de résolution d'un microscope photonique classique est d'environ 0,2 µm alors que la limite de résolution d'un microscope électronique en transmission est 100 fois plus petite (0.0033 nm à 100 keV). Il existe néanmoins des contraintes liées à l'utilisation des électrons : la présence d'un vide poussé dans la colonne du microscope est indispensable, ainsi que l'utilisation d'échantillons minces. Dans un microscope électronique lorsque le faisceau d'électron rencontre un échantillon il se produit plusieurs phénomènes résumés dans la figure 17 sous le nom d'interactions électron-matière. Ces phénomènes dépendent de l'énergie des électrons incidents et de l'épaisseur de l'échantillon. Dans un échantillon mince (< à  $1\mu m$  à 100 keV), comme dans notre cas, une partie des électrons incidents n'interagit pas avec les atomes de l'échantillon, ils sont transmis directement sans variation dans leurs trajectoire et énergie. Les électrons qui interagissent avec les atomes de l'échantillon sont alors soit diffusés élastiquement ou inélastiquement et/ou soit diffractés si l'échantillon est cristallin. Dans le cas des électrons diffusant élastiquement, ceux qui subissent une déviation de leur trajectoire lorsqu'ils passent à proximité du noyau, ont leur énergie cinétique et leur vitesse qui restent constantes. Alors que les électrons qui diffusent inélastiquement, perdent une partie de leur énergie après collision avec les électrons des noyaux atomiques des éléments qui composent l'échantillon. Cette perte d'énergie est caractéristique de l'élément avec lequel ils ont interagit et leur trajectoire initiale est déviée (figure 16). Les électrons peuvent même être rétrodiffusés s'ils passent très près du noyau. Ils sont alors déviés d'un angle supérieur à 90° et peuvent donner une information sur la composition chimique de l'échantillon.



Figure 16: Interaction des électrons avec les atomes des échantillons Les électrons incidents ont une énergie  $E_0$ . Aprés interaction avec les atomes une partie des électrons est non diffusée et conserve son énergie initiale  $E_0$ , une partie est diffusée soit sans perte d'énergie (diffusion élastique) soit avec perte d'énergie (diffusion inélastique).

L'énergie perdue par les électrons inélastiques est transmise aux atomes de l'échantillon. Cette énergie acquise place l'atome dans un état excité (instable). Les atomes tendent à revenir à leur état stable, ils se détendent en éliminant cette énergie sous forme de rayons X (cathodoluminescence), de photons X ou d'électrons Auger. Ces énergies de relaxation sont l'empreinte digitale de chaque élément, elles sont caractéristiques d'un atome donné, et c'est pour cela qu'elles sont utilisées en analyse chimique. Elles sont détectées par divers détecteurs et elles nous donnent des informations sur l'échantillon. La spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*)) mesure le nombre de rayons X émises par rapport à leur énergie. Elle est utilisée pour l'analyse élémentaire qualitative et quantitative. Les électrons Auger, peu énergétiques donnent une information chimique de surface de l'échantillon. La microscopie à balayage exploite les électrons Auger, rétrodiffusés et les électrons secondaires qui sont des électrons faiblement liés, éjectés de l'échantillon. Alors que les électrons transmis, les électrons à diffusion élastique et à diffusion inélastique sont exploités par la microscopie électronique à transmission (figure 17).



Figure 17: Les signaux après interaction du faisceau d'électrons avec les atomes de l'échantillon

## IV-2- La microscopie électronique à transmission (MET)

Le microscope électronique à transmission est un type de microscopie électronique, développé par Max Knoll et Ernst Ruska en Allemagne en 1931. Le microscope est constitué d'un canon à électrons (source d'électron et accélérateur), d'un système d'illumination qui comporte des condenseurs qui focalisent le faisceau d'électron incident, qui assurent le transfert du faisceau d'électrons de la source à l'échantillon et qui contrôlent l'illumination de l'échantillon par la taille et l'intensité du faisceau. Enfin il comporte un objectif et un ensembe de lentilles qui reprennent l'image formée par l'objectif pour la projeter sur l'écran d'observation ou sur des détecteurs. La lentille objective est la lentille la plus importante du microscope car elle va donner la première image agrandie de l'objet (environ X10) (image intermédiaire) dans son plan image. Cette image est reprise par un ensemble de lentilles d'agrandissement (lentilles intermédiaires et de projection) pour donner une image agrandie finale. La résolution de l'image dépend de la qualité de cette lentille et en particulier du microscope. La lentille intermédiaire forme soit un cliché de diffraction (voir plus loin), si le plan objet coïncide avec plan focal de lentille objectif, soit une image agrandie, si son plan objet coïncide avec le plan image de lentille objectif. En modifiant la distance focale des lentilles intermédiaires (en pratique en variant le courant dans les bobines intermédiaires) on passe alors d'un mode diffraction à un mode image. Les lentilles intermédiaires vont agrandir l'image intermédiaire et les lentilles projecteurs projettent l'image finale agrandie sur un détecteur qui peut être un écran fluorescent ou scintillateur couplé à une caméra CCD (figure 18).

La MET exploite tous les électrons transmis et diffusés au travers de l'échantillon pour donner une image. La transmission des électrons non diffusés à travers un échantillon est inversement proportionnelle à l'épaisseur de l'échantillon mais également dépend de la densité et de la nature chimique de l'échantillon. Ainsi les zones épaisses de l'échantillon auront moins d'électrons transmis non diffusés et apparaitront alors plus sombres, à l'inverse, les zones plus fines qui laissent passer plus d'électrons transmis non diffusés apparaitront plus claires. Si le phénomène de diffraction est possible avec l'organisation de la structure (structure cristalline), les électrons diffractent élastiquement (sans perte d'énergie) dans l'objet en suivant la loi de Bragg. Ils sont ensuite transmis à travers la lentille pour faire une image ou un cliché de diffraction. Dans le cas des matériaux amorphes seuls la diffusion élastique et inélastique apparaît.



Figure 18: Schéma du microscope électronique

 $A: Système \ d'illumination, \ B: \ Lentilles \ condenseur, \ C: \ Porte \ objet, \ D, \ E: \ Lentille \ magnétique, \ F: \ Système \ d'observation.$ 

Comme tous les électrons incidents ont la même énergie (longueur d'onde), les électrons diffractés par le même plan atomique seront diffractés selon le même angle. Ces électrons interfèrent à travers la lentille objective électromagnétique pour former le cliché de diffraction constitué de points. Chaque point correspond à un plan atomique spécifique dans une orientation particulière dans le cliché de diffraction. Son analyse peut alors fournir des informations sur l'orientation, les arrangements atomiques et les phases présentes dans la zone examinée. Les électrons incidents qui interagissent avec les atomes de l'échantillon de manière inélastique, perdent de l'énergie pendant l'interaction. Ces électrons dispersés inélastiquement peuvent être utilisés en Spectroscopie de perte d'énergie des électrons (EELS, *Electron Energy Loss Spectroscopy*) qui peut nous fournir la composition élémentaire et la nature des liaisons atomiques.

En fonction de type d'électrons utilisés pour former l'image on a deux modes

d'observation, l'observation en fond noir et l'observation en fond clair.

### a- L'observation en fond clair

Si un diaphragme objectif est placé dans le plan focal de manière à sélectionner uniquement le faisceau transmis (faisceau non dévié) issu de l'échantillon, c'est donc uniquement les électrons non diffractés qui formeront l'image sur l'écran. Les zones de l'échantillon diffractant fortement le faisceau apparaissent donc en plus sombres alors que les zones ne diffractant pas l'échantillon transmettent toute la lumière et apparaissent claires. En absence de diaphragme objectif tous les faisceaux transmis et diffractés sont utilisés pour former l'image, le contraste de l'image dépend alors du numéro atomique des constituants de l'échantillon. Les éléments lourds apparaissent sombres et les éléments légers clairs. Ce mode sans diaphragme offre cependant un moins bon contraste. En général, on introduit donc un grand diaphragme objectif (90  $\mu$ m) qui laisse passer le faisceau direct et peu ou pas de faisceaux diffractés. Ces conditions conduisent à une image en fond clair contrasté que l'on appelle souvent fond clair, d'où le nom : fond clair (« Bright field ») (figure 19A).

### b- L'observation en fond noir

Lorsqu'on utilise un petit diaphragme dans un plan focal, on peut sélectionner les faisceaux d'électrons qui diffractent à un angle particulier et/ou qui diffusent uniquement pour former une image. L'image est donc formée uniquement par les électrons diffractés à un angle particulier, les zones de l'image qui diffractent à des angles différents apparaissent sombres. On obtient une image claire sur un fond noir, d'où le nom fond noir (« Dark field »). L'angle de diffraction dépend du numéro atomique (Z) des constituants de l'échantillon. Plus le Z d'un atome est élevé, plus il absorbe les électrons et plus il diffracte les électrons à grand angle. Ainsi l'utilisation d'éléments atomiques lourds permettra de réaliser un fond noir efficace si on utilise les faisceaux diffractés aux grands angles. Dans notre cas nous utilisons l'acétate d'uranyl (Z = 92) et nous travaillons dans un mode fond noir annulaire ou cristallographique. Pour le fond noir annulaire on utilise un diaphragme (figure 19B). Pour le fond noir cristallographique nous tiltons le faisceaux diffractés aux grands angles (figure 19B). Pour le fond noir cristallographique nous tiltons le faisceaux diffractés aux grands angles (aux angle particulier pour nous permettre de sélectionner là encore tous les faisceaux diffractés aux grands angles (figure 19B).



Figure 19: Les modes d'observations en microscopie electronique à tranmission A : Observation en fond clair, les électrons du faisceau transmis sont utilisés pour obtenir l'image. B : Observation en fond noir : Les électrons du faisceau transmis à un angle  $\theta$  sont utilisés pour former l'image.

# IV-3- Les techniques de préparation des échantillons

Les techniques de préparation et d'observation des échantillons dépendent de la nature de l'objet biologique et de la nature de l'étude réalisée. La coloration négative des macromolécules biologiques et l'observation en fond clair nous donnent accès à des informations sur la structure 2D et 3D de ces macromolécules. La coloration positive et l'observation en fond noir annulaire (techniquedéveloppée au laboratoire) ou cristallographique nous permet d'analyser finement les molécules d'ADN seuls ou les complexes ADN-protéine. Dans ces deux approches l'échantillon est étalé sur un film mince de carbone et sont traités avec de l'acétate d'uranyle, agent contrastant. Dans la coloration positive cet agent a une double fonction, il permet de déployer les molécules d'ADN sur la surface tout en augmentant le contraste pour l'observation de l'échantillon (378). Enfin la cryo-microscopie a été développée pour réaliser des structures en 3D à haute résolution en s'affranchissant des problèmes liés à l'utilisation d'agents contrastants. Au cours de ce processus, les échantillons sont piégés dans un film de glace amorphe.

Chaque fois que l'on souhaitera obtenir une information structurale des observations il faudra travailler avec un faisceau dont on contrôle la dose d'électron (mode low-dose).

### a- La coloration négative

La technique a été développée par Brenner et Horne en 1959 pour étudier la forme externe et la structure des virus (379), depuis elle est utilisée pour l'analyse de la structure des macromolécules biologiques (380). Les macromolécules biologiques sont composées d'atomes légers (C, H, O, N et P), quand les faisceaux d'électron interagissent avec l'échantillon, la diffusion des électrons en contact avec ses atomes est très faible ce qui se traduit par un faible contraste dans l'image et la difficulté à visualiser les macromolécules biologiques. L'utilisation des agents contrastant (métaux lourds) augmente le contraste dans l'image. En coloration négative (CN) l'échantillon est adsorbé sur une grille collodion carbone ou carbone seul (381) et enveloppé dans une couche d'agent contrastant (voir protocole CN). Outre l'acétate d'uranyle à 1% ou 2% (poids/volume), plusieurs autres solutions contenant des métaux lourds sont utilisées comme l'acide phosphotungstatique ou encore l'acide phosphomolibdique (382).

L'étape critique dans la réussite d'une coloration négative est la réalisation de la couche d'enrobage de contrastant. Cette couche doit être d'épaisseur égale ou légèrement supérieure à la molécule que l'on observe. Pour réaliser cette étape on procède par l'absorption manuelle par capillarité de la solution de contrastant avec un papier filtre sans cendre. Si les molécules ne sont pas complètement couvertes par le colorant, l'image observée n'intègre pas les éléments non couverts ou si l'assèchement est trop important les molécules peuvent être applaties ou déformées. Parfois les contrastants n'épousent pas parfaitement le contour de la molécule, ainsi les images et les volumes observés sont déformés. Ces inconvénients font que la résolution des reconstructions 3D à partir d'images obtenues en coloration négative est autour de 25 Å. Malgré ces différents inconvénients, la coloration négative reste une méthode très utilisée en microscopie électronique du fait de la rapidité de la préparation des échantillons. Elle permet souvent d'obtenir un premier volume à basse résolution et d'avoir une forme globale de la molécule. De plus, elle permet souvent de mettre au point les conditions pour passer ensuite à une étude en Cryo-MET.

### b- La coloration positive

La coloration positive est une technique de MET utilisée pour l'analyse des molécules

d'ADN seules ou des complexes ADN-protéine. Une étape clé dans la préparation des échantillons est l'adsorption des molécules sur le support. J. Dubochet a développé une technique d'adsorption des molécules d'ADN sur un support (fin film de carbone) préalablement chargée positivement, suivit d'une coloration positive avec l'acétate d'uranyle (383). Contrairement à la coloration négative, la coloration positive « décore » l'échantillon avec le contrastant ici l'acétate d'uranyle. L'acétate d'uranyle a alors une double fonction d'une part elle va permettre le déploiement des molécules d'ADN sur la surface en conservant les propriétés conformationnelles de l'ADN ou des complexes ADNprotéine et d'autre part, les groupements d'uranyle interagissent avec les groupements phosphate de la chaine sucro-phosphate de l'ADN, créant des clusters d'uranyle le long de l'ADN. La courbure et la flexibilité locale de l'ADN peuvent être quantifiées par des méthodes statistiques d'analyses d'images développées au laboratoire (378)(384)(385). Le laboratoire est donc capable de caractériser et de quantifier des modifications de conformation de l'ADN par des protéines (386)(387). Des études cinétiques, l'analyse d'assemblage et de remodelage des complexes peuvent également être réalisées (86)(388). L'analyse statistique des observations permet de quantifier les paramètres étudiés (conformation de l'ADN, cinétiques de réaction, assemblage et remodelage) mais il est également possible d'extraire des événements rares individuels.

## IV-4- Cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-MET)

a- Les principes de la Cryo-microscopie électronique à transmission

En 1984, Dubochet et ses collègues ont révolutionné la microscopie électronique des particules uniques en introduisant une nouvelle méthode de préparation des échantillons : la vitrification. Pour ces travaux Jacques Dubochet a reçu le prix Nobel de chimie en 2017 avec Joachim Frank et Richard Henderson. Cette technique consiste à congeler très rapidement des échantillons biologiques conservant ainsi leur état natif dans une glace amorphe c'est-à-dire sans cristaux. La vitrification rapide soit au-delà de 3 m/sec de l'eau liquide de l'échantillon empêche la formation des cristaux de glace (glace cubique ou glace hexagonale). Ces deux types de glace ne gênent pas l'observation mais apporte du bruit dans l'image (motif de diffraction figure 20B) et interfèrent beaucoup avec les signaux des molécules pour la reconstruction (figure 20) (389)(390). L'échantillon cryofixé ne doit subir aucune remontée de température aux risques de transformer la glace amorphe en glace cubique puis hexagonale. Il est donc stocké dans l'azote liquide. Le

développement de nouveaux algorithmes de traitement d'images ont permis d'obtenir des structures 3D à une résolution (3-4 Å) proches de celles obtenues en cristallographie.



*Figure 20: Les différents états de la glace* A : les différents type de glace, B-a : glace hexagonale, b: glace cubique et c : glace vitreuse.

b- La préparation des grilles utilisées en Cryo-TEM

Les grilles utilisées en Cryo-TEM sont des grilles de Cu recouvertes d'un fin film de carbone à trous.



Figure 21: Les grilles utilisées en Cryo-MET

a-grille cryo-MET commerciale, les carres représentent la maille élémentaire de la grille, b-zoom sur un carré, on observe les trous de taille calibrée espacés régulèrement c-on observe des trous irréguliers ressemblant à un maillage.

Il existe plusieurs types de carbone à trous : des carbones avec des trous circulaires calibrés de 0,5 à 4  $\mu$ m de diamètre espacés de 1 à 4  $\mu$ m (les grilles quantifoil ou les C-flat, figure 21B) et des carbones avec des trous irréguliers qui ressemblent d'avantage à un filet (grilles Lacey ou Holey, figure 21C) (391). Le choix du type de grilles dépend du type et de la taille de l'échantillon. Dans notre cas, comme nous souhaitons analyser des filaments de plusieurs  $\mu$ m de longueur, les grilles lacey sont les plus adaptées.

### c- La Cryo-fixation

Les premiers cryoplongeurs étaient des systèmes entièrement manuels. Depuis une dizaine d'années, il existe deux systèmes types automatisés mais le principe n'a pas changé. La cryo-fixation est l'étape de vitrification de l'échantillon, la grille sur laquelle on dépose l'échantillon est placée au bout d'une pince et est mise en place sur le plongeur « guillotine » (389). Avec un papier absorbant, l'excès de la solution est absorbé (« blotting » en anglais) pour former une couche aqueuse mince dans les trous du film de carbone. L'appareil dispose d'un système de déclanchement qui permet de plonger la grille dans le milieu cryogénique à savoir en général de l'éthane liquide refroidi par un bain d'azote liquide. En effet on préfére l'éthane liquide à l'azote liquide car ce dernier possède une meilleure capacité calorifique que l'azote tout en étant liquide à des températures supérieures à celle de l'azote. La vitesse de trempe est très importante, c'est elle qui va conditionner la formation de glace amorphe (> à 3m/s). L'échantillon cryofixé doit être stocké à froid dans l'azote et pour tous les déplacements, il est maintenu dans les vapeurs d'azote liquide pour éviter la formation des cristaux de glace (figure 22).





Après la phase de blotting, un système déclencheur permet de plonger rapidement une grille tenue par une pince dans une cuve contenant le cryogène (l'éthane liquide). Ce dernier est maintenu à l'état liquide par un bain d'azote liquide. La grille est ensuite rangée dans un réceptacle dans les vapeurs d'azote afin d'éviter tout réchauffement.

Les plonges automatiques ont été équipées d'une chambre pour le dépôt de l'échantillon sur la grille permettant ainsi de contrôler la température et l'humidité, minimisant l'évaporation de l'échantillon, et maintenant les conditions physico-chimiques des macromolécules en solution. L'étape clé du « « blotting » qui conditionne l'épaisseur du film de glace a été automatisé permettant de contrôler la durée et le temps de blotting et donc augmentant ainsi la reproductibilité (figure 23). Enfin un système permet de contrôler et de maintenir la température de l'éthane. Effectivement un autre point délicat consiste à maintenir la température de l'éthane entre -180 et -182°C pour que l'éthane reste liquide car au-delà, l'éthane est pateux et solide et devient impropre à la cryofixation.

Deux systèmes sont commercialisés, un système qui permet de « blotter » l'échantillon par les deux faces de la grille et un système qui permet de « blotter » l'échantillon seulement par une face (figure 23). Nous avons utilisé sur la plateforme de microscopie de l'Institut Pasteur le deuxième système.



Figure 23: Préparation des échantillons en Cryo-TEM

a- système de vitrification, b-le système « blot » la grille automatiquement en approchant le papier filtre de la grille et en appliquant la pression et le temps de contact choisis, c-le système déclenche juste après le blot, la plonge de la pince dans l'éthane liquide refroidie par un bain d'azote liquide.

## d- Le cryo-transfert

L'échantillon est transféré dans un porte-objet cryo du microscope à l'aide d'une station de transfert (figure 24). Le porte objet en lui-même est équipé d'un dewar à azote liquide qui refroidit l'échantillon. La station de transfert permet de déplacer la grille de la boite de stockage au porte-objet dans les vapeurs d'azote liquide pour minimiser le contact avec l'air et la formation des cristaux de glace. Cette étape est très délicate elle nécessite l'utilisation d'un système spécifique (figure 24).



Figure 24: Système de transfert d'échantillons

A-schéma du système de transfert avec le porte-objet. B-Chambre de transfert des grilles vers le porte-objet cryo dans les vapeurs d'azote liquide. C- Station de transfert et porte-objet utilisé.

### e- L'observation en mode low dose

L'échantillon est introduit à l'aide du porte-objet cryo dans la colonne sous vide du microscope. Les échantillons sont observés avec le mode d'illumination à faible dose d'électrons (inférieur à 10 électrons/Å<sup>2</sup>). Le choix de la dose d'électron est un compromis entre la nécessite d'avoir un bon rapport signal sur bruit et la préservation de l'échantillon des dommages du faisceau d'électron.

### f- Avantages et inconvénients de la Cryo-MET

La cryo-microscopie électronique est une technique importante en biologie structurale car elle permet l'observation directe de macromolécules dans leur état natif hydraté (389)(392) (393). Ce mode de préparation élimine non seulement les distorsions dues à la déshydratation et à l'adsorption, mais aussi les contraintes de l'utilisation d'un colorant. Des structures à haute résolution peuvent être obtenues même avec des molécules assez petites dans de la glace vitrifiée (394)(395). Les molécules adoptent généralement des orientations plus au moins aléatoires dans la couche de glace amorphe offrant des vues 2D différentes de la molécule. Ces vues peuvent être exploitées pour la reconstruction 3D (396). Alors que ces orientations aléatoires sont un avantage pour des échantillons homogènes, elles créent un problème pour un échantillon hétérogène. Pour obtenir une reconstruction 3D fiable d'une molécule, il est essentiel que seules les images de molécules identiques soient combinées et cela nécessite un nombre d'images conséquentes (397). Cette difficulté est maintenant surmontée avec la mise en place de microscope qui peuvent prendre des photos en automatique sur plusieurs jours.



Figure 25: Les dommages observés dans les échantillons congelés après exposition à des doses croissantes d'électrons a : 20  $e^{-}/A^{\circ 2}$ , b : 40  $e^{-}/A^{\circ 2}$ , c : 60  $e^{-}/A^{\circ 2}$  et d : 80  $e^{-}/A^{\circ 2}$ .

L'échantillon congelé peut rapidement se dégrader, si on dépasse la dose de 20 électrons/Å<sup>2</sup>, on provoque des dommages d'irradiation sur les échantillons congelés (« bubbling » des particules dans l'eau vitreuse) ainsi qu'une perte des détails des structures (398)(399)(400). Une des contraintes majeures de cette technique est donc la nécessité de travailler à la température de l'azote liquide et dans le maintien de la chaine du froid pour la préparation des échantillons jusqu'à l'observation au microscope.

## IV-5- Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (ou AFM (*Atomic Force Microscopy*)), est un type de microscopie à sonde locale qui permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. L'AFM analyse point par point la surface (balayage) grâce à une sonde, les céramiques piézoélectriques permettant des déplacements latéraux et verticaux de quelques Angströms à plusieurs centaines de micromètres. La sonde est constituée d'une pointe très fine (5 à 20 nm), situé à l'extrémité d'un microlevier flexible et réfléchissant. La sonde mesure les interactions (attractives ou répulsives) entre la pointe et les atomes à la surface de l'échantillon. Ces forces engendrent une déviation du microlevier qui est analysée à l'aide d'un faisceau laser réfléchi du microlevier vers une photodiode circulaire à quatre

cadrans (le détecteur), qui convertit les déplacements du spot laser en signaux électriques. Les signaux enregistrés sont ensuite traités et convertis en image (figure 26).



Figure 26: Schéma des composants d'un microscope à force atomique

Il existe plusieurs modes d'imagerie, les plus utilisés sont le mode contact et le mode contact intermittent (« tapping mode » en anglais). Dans le mode contact, le microlevier muni de la pointe appuit sur l'échantillon en balayant la surface. Une force répulsive est créée entre la pointe et l'échantillon. Ce mode d'imagerie peut fonctionner soit à hauteur constante (le microlevier balaye à une hauteur constante au-dessus de la surface) soit à force constante (la force avec laquelle le microlevier vient palper la surface est maintenue constante au cours du balayage par l'intermédiaire d'une rétroaction). Ce mode n'est pas utilisé pour l'étude des échantillons biologiques, les forces de frottement entre la pointe et la surface risquent d'endommager les échantillons. Dans le mode contact intermittent on fait vibrer le microlevier à sa fréquence de résonance libre avec une certaine amplitude. L'oscillation du microlevier est généralement excitée par la vibration d'un cristal piézoélectrique, ce mode d'excitation, est appelé mode acoustique. Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude décroit (parce que la fréquence de résonance change). Les forces appliquées sur la surface sont très petites et le temps de contact est très court. La pointe effleure la surface de l'échantillon et le contacte n'engendre pas de dommages au niveau de l'échantillon. Ce mode est de loin le plus utilisé pour la caractérisation des échantillons biologiques.

Pour l'observation en AFM, les molécules biologiques telles que l'ADN, les complexes ADN-protéine sont étalés sur une surface, les conditions d'étalement doivent maintenir les propriétés natives des molécules (structure, conformation...). Le support d'étalement le plus utilisé est le mica, d'autres matériaux sont aussi utilisés incluant le verre, le silicium, le graphite HOPG, l'or et les bicouches lipidiques (401). La caractérisation des conditions d'étalement et d'adsorption a fait l'objet de travaux dans plusieurs laboratoires et tout particulièrement dans notre laboratoire qui a travaillé sur les conditions l'étalement d'ADN et des complexes ADN-protéine sur une surface mica (402)(403)(404). Il existe différents types de mica et les propriétés d'adsorption de l'AFM varie en fonction du type de mica (Thèse Sylvie Boichot 2000) mais on utilise principalement le mica muscovite qui a une structure cristallographique en feuillets de silicates reliés par des couches d'ions potassium (405). Il est facile d'obtenir par clivage une surface dont la propreté et la planéité à l'échelle atomique sont bien adaptées à l'imagerie de macromolécules individuelles comme l'ADN et les protéines. Lors du clivage la séparation se fait au niveau des plans d'ions potassium ( $K^+$ ), ces ions ne sont pas répartis de façon homogène à la surface du mica. Un des avantages d'utiliser ce mica est la possibilité de réaliser un échange d'ions entre le potassium à la surface du mica et les ions dans les solutions déposées sur le mica (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et H<sup>+</sup>) (406)(407). L'étalement de l'ADN sur la surface de mica nécessite un traitement au préalable du mica, il existe plusieurs méthodes incluant l'utilisation de cation divalents (magnésium), ou la fonctionnalisation de la surface avec des groupes chimiques chargés positivement (APTES (3- amino propyl triethoxy silanes)) ou avec des acides aminés chargés positivement (poly-Lysine)) (408)(409)(410)(411). Ces groupements sont utilisés pour maintenir l'ADN à la surface du mica, les résultats d'étalement des complexes ADN-protéine avec ces deux méthodes ne sont pas satisfaisants. Des conditions d'adsorption de l'ADN sur le mica ont été définies par notre laboratoire ; elles reposent sur l'utilisation de la spermidine de la famille des polyamines comme agent de liaison de l'ADN au mica (412)(413). A faible concentration (quelque dizaines de  $\mu$ M), la spermidine permet une adsorption efficace de l'ADN indépendamment de la concentration en sel comme le NaCl (300 mM) (414). On peut aussi étudier les complexes nucléoprotéiques quelque soit la force ionique alors qu'auparavant, l'étalement de l'ADN ou des complexes nucléoprotéiques nécessitait une très faible concentration en sel monovalent et une forte concentration en Magnésium.

Un aspect fondamental de l'utilisation de l'AFM est la possibilité de travailler en milieu liquide. Cette technique permet d'étudier les objets biologiques dans des conditions proches des conditions natives, en temps réel et avec une bonne résolution. Ceci est rendu possible par l'ajout d'une cellule imperméable contenant une centaine de µl de liquide. Ce système comporte une entrée et une sortie de liquide qui permettent d'injecter les solutions, de changer les conditions ioniques, de laver l'échantillon …) (figure 27) (401)(415). Des études de la dynamique des molécules peuvent être réalisées avec une résolution temporelle de quelques secondes. Cette dernière est améliorée avec le développement par le laboratoire de Toshio Ando de l'AFM à haute vitesse (HS-AFM-High Speed AFM) (416).



Figure 27: Schéma de la cellule liquide de l'AFM

# V- Axes de recherche du laboratoire et objectifs de la thèse

Le laboratoire d'accueil est rattaché à l'UMR 8126, Signalisation, noyaux et innovations en cancérologie au sein de Gustave Roussy à Villejuif. Les thématiques développées au sein de l'équipe concernent la réplication, la réparation et la recombinaison de l'ADN. Le laboratoire est réputé pour son savoir faire et sa maitrise des techniques de microscopie à savoir la microscopie électronique à transmission, la cryo-microscopie électronique à transmission et la microscopie à force atomique. Le laboratoire présente des compétences dans la structure d'ADN et des mécanismes d'interactions ADN-protéine qui ont été le socle pour l'analyse et la compréhension de mes résultats de thèse.

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie de Saclay qui est maintenant au sein de l'I2BC à Gif sur Yvette (Equipe Enveloppe Nucléaire, Télomères et Réparation de l'ADN). Il porte sur la caractérisation structuralle et fonctionnelle des complexes multiprotéiques impliqués dans la voie NHEJ humaine. La voie NHEJ est l'une des voies principales de la réparation des CDBs chez les mammifères. La réparation par cette voie nécessite au minimum deux étapes ; une étape de reconnaissance qui implique l'hétérodimère Ku70/Ku80 et une étape de ligation par la Ligase IV. La Ligase IV fait partie d'un complexe multiprotéique connue sous le nom du complexe de ligation qui inclut XRCC4 et XLF. Ces deux protéines ne présentent aucune activité enzymatique et leurs fonctions exactes sont en cours de caractérisation. Des études structurales en utilisant des formes tronquées de XRCC4 et XLF dépourvue du domaine C-ter montrent que dans un mélange équimolaire XRCC4 tronqué et XLF tronqué forme des filaments avec une succession d'un dimère de XRCC4 et un dimère de XLF qui interagissent par leurs domaines tête N-ter. Mon travail de thèse comporte plusieurs objectifs. Le premier est de caractériser l'assemblage et la structure des formes entières de XRCC4 et XLF combinant des approches biochimiques et des approches de microscopies moléculaires. Le deuxième est de caractériser l'interaction de ces protéines XRCC4, XLF et XRCC4-Ligase IV avec l'ADN. Le troisième objectif consiste à comprendre l'interaction entre les partenaires du complexe de ligation et le complexe de reconnaissance (ADN-Ku). Les informations obtenues nous permettent de comprendre l'impact de XRCC4 et XLF sur la ligation par la Ligase IV et de proposer un modèle d'assemblage des protéines de la voie NHEJ.

# B- Matériels et méthodes

# I- Expression des protéines recombinantes

Les protéines recombinantes utilisées dans mon travail de thèse sont produites dans l'équipe Enveloppe Nucléaire, Télomères et Réparation de l'ADN, l'I2BC Gif sur Yvette. Elles sont exprimées soit dans un système procaryote E. Coli (*Escherichia coli*) soit en utilisant la méthode d'expression multiBac de protéines en cellules d'insectes infectées par baculovirus (figure 28).



Figure 28: Schéma des étapes clés d'expression des protéines avec le système MultiBac Figure adaptée de Shuya Fukai, 2016

La production des protéines recombinantes chez E. coli est en général mieux controlés et plus rapide mais les protéines ne portent pas de modifications post-traductionnelles. Le système eucaryote permet la production de protéines recombinantes possédant des modifications post-traductionnelles. L'avantage du système bacculovirus est surtout la coexpression et coproduction de protéines (système MultiBac). Les protéines XRCC4, XLF (sauvages ou mutants) sont produites chez *E. coli*, alors que Ku70/Ku80, XRCC4-Ligase IV sont purifiées à partir des cellules d'insectes. Une étiquette poly-histidine (Tag 6 His) est ajoutée au niveau de la région C-ter des protéines. Une fois purifiées, les protéines recombinantes sont concentrées, quantifiées et conservées à -80°C dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8 NaCl 150 mM (Tampon A).

# II- Caractérisation des complexes protéiques

# II-1- Analyses par microscopie électronique à transmission

XRCC4<sub>FL</sub>, XLF<sub>FL</sub> seules et le mélange de XRCC4<sub>FL</sub>, XLF<sub>FL</sub> à différentes concentrations sont analysés en MET pour déterminer la nature des oligomères formés en solution. Un mutant de XRCC4 dépourvu du domaine C-ter (XRCC4<sub>203</sub>) est analysé en MET pour déterminer l'impact du domaine tronqué sur la nature des oligomères observés en solution. Les protéines sont analysées en utilisant les deux modes de préparation et d'observation en MET. Des mélanges de XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> avec différents rapports XRCC4 : XLF sont aussi analysées en MET avec les deux modes de préparation et d'observation.

### a- Coloration négative et observation en fond clair

### al-Préparation des grilles

En coloration négative, j'utilise des grilles en cuivre avec un maillage carré (grilles 300 mesh). Les grilles sont d'abord couvertes d'une fine couche de collodion (nitrocellulose, film transparent). Une goutte de collodion est déposée à l'interface eau/air ce qui induit sa polymérisation en un film de plastique transparent, les grilles sont déposées sur le film la face de dépôt d'échantillon sur le film de collodion. On récupère les grilles collodion à l'aide d'un papier filtre sans cendre. Une fois séchées, les grilles sont déposées sur un support dans une cloche sous vide d'un système d'évaporation de carbone de type Balzers MED10. Un morceau de tresse de carbone (~4 cm) est fixé à deux électrodes au dessus des grilles à une distance d'environ 6 cm. Un cache protecteur est placé entre les grilles et la tresse de carbone. Dans un premier temps la tresse est dégazée en la chauffant à haute
tension et à une pression de 5.  $10^{-4}$  mbar pendant 45 s, cela permet d'éliminer toutes les impuretés. Lorsque la valeur du vide atteind  $7.10^{-5}$  mbar, on retire le cache et on chauffe la tresse à nouveau pendant 30s, le carbone s'évapore et se dépose sur les grilles en formant un film de carbone. L'épaisseur du film de carbone dépend de la distance entre la tresse et les grilles, du vide dans la cloche et du temps d'évaporation du carbone. Le film de collodion et la couche de carbone vont servir de support physique à l'échantillon que l'on dépose sur la grille de microscopie.

#### *a2-Effluvage des grilles*

Le carbone étant généralement hydrophobe, on réalise un effluvage du film de carbone c'est-à-dire que l'on ionise les éléments de l'air avec un plasma sous vide pour rendre la surface des grilles plus accessible à l'eau et à l'échantillon en suspension. Les grilles collodion-carbone sont placées dans une cloche en verre entre une anode et une cathode sous vide dans l'appareil Balzers MED10. On réalise une entrée d'air constante que l'on équilibre pour avoir un vide proche de 7.10<sup>-1</sup> mbar dans la cloche. On applique une tension entre la cathode et l'anode, le potentiel électrique ionise l'air à l'intérieur de la cloche. Les ions formés se déposent sur le carbone, ce qui donne un film de carbone avec une surface globalement hydrophile. Ce procédé est connu sous le nom plasma « glow discharge » (417).

# a3- Préparation des échantillons

XRCC4<sub>FL</sub> ou XLF<sub>FL</sub> seuls sont dilués dans le tampon A Tris HCl 10 mM pH 8 NaCl 150 mM à une concentration finale de 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M ou 4  $\mu$ M. Un mélange de XRCC4 et XLF avec des rapports (XRCC4 : XLF) de (1 :1), (1 : 0,5) ou (0,5 : 1) sont incubés 10 min à température ambiante (TA) dans le même tampon que les protéines seules.

# a4- Coloration négative et observation en fond clair

Un volume de 5µl des échantillons est déposé sur les grilles adaptées à la méthode coloration négative. L'échantillon est incubé 30s à Température Ambiante (TA) pour laisser les protéines s'adsorpber sur le film de carbone. L'excès de solution est éliminé et remplacé avec une goutte d'acétate d'uranyle 2% en inclinant la grille à 45°C. On attend 60 s à TA, puis la grille est séchée à l'aide d'un papier filtre sans cendre type wathman. Cette étape est déterminante puisqu'elle définit la qualité de la coloration (l'épaisseur et

l'homogénéité de la couche du colorant) et par conséquence la qualité des images obtenues. Les grilles sont conservées dans une boite de grilles.

L'observation se fait à l'aide d'un microscope électronique à transmission Zeiss 912AB Omega avec une tension d'accélération de 120 kV. Cette machine est équipée d'une source d'électrons type LaB6 (cristal d'hexaborure de lanthane), d'un filtre d'énergie et d'une camera CCD (Charge Coupled Devices) Tengra (Olympus) contrôlée par le logiciel iTEM (Olympus).

La grille est insérée dans la colonne du microscope sous vide où elle est soumise à un faisceau d'électron. Une fois que le microscope est réglé pour l'observation en fond clair, plusieurs séries de photos sont collectées.

# b- Coloration positive et observation en fond noir

Dans l'analyse des complexes protéiques, cette approche nous permet d'analyser des molécules individuellement. Elle nous permet de faire des études qualitatives et des études quantitatives. Dans les dernières, deux paramètres sont alors quantifiés à savoir la taille et le nombre des filaments  $XRCC4_{FL}$  en fonction de la concentration de XRCC4, de la température et du temps ou en présence de l'ADN ou en présence d'XLF.

## b1-Préparation du carbone

Un film très fin de carbone (quelques nanomètres) est déposé sur une feuille de mica lisse fraichement clivée. Le protocole d'évaporation de carbone diffère légèrement de celui décrit en coloration négative : on utilise une demi-tresse de carbonne et l'échantillon est placé à au moins 12 cm des électrodes, enfin ce sont les feuilles de mica qui sont utilisées pour déposer le carbone. Ces conditions nous permettent de réaliser des films très fin de carbone (< 5nm) indispensable à l'observation en fond noir. Le carbone sur les feuilles de mica est séché toute la nuit avant d'être utilisé.

# *b2-Préparation des grilles*

En coloration positive on utilise des grilles de cuivre qui possèdent des alvéoles hexagonales (600 mesh) sur lesquelles on dépose le film très fin de carbone (quelques nanomètres). On dépose les grilles sur un papier sans cendre, sur un grillage au fond d'une grande boite de pétri remplie d'eau milliQ (système millipore) dégazée. Le mica recouvert d'un fin film de carbone est plongé dans l'eau avec un angle d'inclinaison d'environ 45°

par rapport à la surface d'eau. Le film de carbone se sépare du mica et flotte à la surface de l'eau alors que le mica tombe au fond de la boite. A l'aide d'un cadre de téflon, on guide le film de carbone au dessus des grilles. En vidant la boite de pétri doucement, le film de carbone se dépose sur les grilles. Les grilles sont séchées toute la nuit à TA avant leur utilisation.

# b3- Ionisation des grilles

L'ionisation par dépôt des groupements  $NH^{3+}$  (charge positive) sur des grilles couvertes de carbone a été initialement développée par J. Dubochet (383). Les grilles sont déposées sur un support entre deux électrodes dans une cloche en verre, reliée à une pompe à vide. Quand le vide atteint la valeur de 15 µmHg ( $2.10^{-2}$  mbar), une goutte d'amylamine est ajoutée, se vaporisant dans l'enceinte sous vide entrainant une dégradation rapide du vide. Le vide est alors controlé et stabilisé à une valeur de 100 µmHg (0,133 mbar). On applique alors une haute tension pendant 40 s, un plasma va ioniser l'amylamine et les groupements  $NH^{3+}$  formés se déposent sur le film de carbone. Au cours de cette étape il faut maintenir un vide entre 100 µm Hg et 130 µm Hg. Après ionisation on casse doucement le vide dans la cloche et on récupère les grilles ionisées. Le dépôt des groupements  $NH^{+3}$  (charges positives) sur le film de carbone permet alors l'adsorption spontanée de l'ADN qui lui est chargé négativement.

# b4- Préparation des échantillons

#### Pour la caractérisation des protéines

Dans certaines expériences nous avons analysé les résultats et décrit les observations, sans faire de quantification ni d'étude statistique. Ces essais ont pour but de caractériser globalement les complexes protéiques. Différentes conditions sont testées.

- XRCC4<sub>FL</sub> à différentes concentrations (5 nM, 50 nM, 0,25  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M et 4  $\mu$ M) dans un tampon A (Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM).

- Un mélange de XRCC4 et XLF avec les rapports stœchiométriques (X4<sub>FL</sub>: XLF<sub>FL</sub>) suivant (1 :1), (1 : 0,5) et (0,5 : 1) est incubé 10 min à 25°C dans le tampon A

- Pour déterminer l'effet de l'ADN sur l'organisation des filaments XRCC4 seul ou les filaments obtenus pour un mélange XRCC4-XLF. XRCC4 à 200 nM est incubé 30 min à 25°C soit avec l'ADN linéaire 1440 pb à 3 nM molécules soit avec l'ADN superenroulé pUC19 à 3 nM molécules dans le tampon A.. Le mélange de XRCC4 à 200 nM et XLF à

200 nM est incubé 30 min à 25°C dans le tampon A en présence de l'ADN (1440 pb) à 3 nM molécules.

#### Pour les études d'assemblage en filament de XRCC4

Afin de comprendre l'assemblage de  $XRCC4_{FL}$  en filaments et caractériser les paramètres physico-chimiques qui modulent cet assemblage, ainsi que l'effet de l'ADN et de XLF, différentes conditions sont étudiées.

- Pour étudier l'effet de la concentration, de la température et du temps sur l'assemblage d'XRCC4 en filament : XRCC4<sub>FL</sub> à une concentration finale de 5 nM, 50 nM, et 250 nM est préparé dans le tampon A. Ces échantillons sont incubés 10 min ou 30 min à différentes températures (4°C, 25°C et 37°C) avant le dépôt avec la méthode de coloration positive et l'observation en fond noir.

 Pour caractériser l'effet de XLF sur l'assemblage de XRCC4 en filament : XRCC4 à 5 nM est incubé 10 min à 25°C dans le tampon A seul ou en présence de XLF avec des rapports stœchiométriques (XRCC4 : XLF) de (1 :1) ou (1 :10).

 Pour déterminer l'effet de l'ADN sur l'assemblage de XRCC4 en filaments : XRCC4 à 5 nM est incubé 10 min à 25°C avec 3 nM molécules d'ADN dans le tampon A. Les fragments d'ADN testés séparément sont des fragments linéaires de 600 pb et 1440 pb.

#### b5- Coloration positive et observation en fond noir

Une goutte de  $5\mu$ l de l'échantillon est déposée sur une grille préalablement ionisée et contrastée avec la méthode de coloration positive. L'échantillon est incubé 30s à TA pour permettre l'adsorption sur la surface chargée positivement. L'excès de la solution est enlevé avec 2 gouttes d'acétate d'uranyle à 2% en inclinant la grille. La grille est ensuite sèchée avec un papier filtre sans cendre. Plusieurs grilles sont préparées pour chaque condition.

Les échantillons sont observés en fond noir en utilisant un microscope électronique à transmission modèle Zeiss 912AB (120 kV). Le laboratoire possède un autre microscope électronique à transmission Zeiss 902 (80 kV). Cette machine est équipée d'une source d'électrons (filament de tungstène courbé en forme de V), d'un filtre d'énergie et d'un diaphragme annulaire pour l'observation en fond noir annulaire. Les deux microscopes sont équipés de cameras CCD (Olympus) pilotées par le logiciel iTEM (Olympus).

Pour chaque condition la taille et le nombre de filaments formés sont quantifiés. Les mesures ont été réalisées en analysant 200 carreaux répartis sur 4 grilles, à savoir 50

carreaux par grille en moyenne. La taille des filaments XRCC4 est mesurée en utilisant l'outil de mesure sur le logiciel iTEM.

## c- Marquage aux billes d'or

La présence de XLF dans les filaments obtenus dans un mélange de XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> est caractérisée par un marquage aux billes d'or. Les billes d'or (5 nm Ni-NTA-Nanogold) consiste en une particule d'or de 5 nm fonctionnalisée avec des groupements Ni-NTA ((nickel (II) nitrilotriacetic acid). Elle est conçue pour la détection ou la localisation de protéines recombinantes avec une étiquette poly-histidine (Tag His) dans des complexes multi-protéiques par microscopie électronique à transmission (MET). Le Tag 6His est constitué de 6 résidus His consécutifs ajouté à la région C-ter de la protéine recombinante dans notre cas XLF<sub>FL</sub> et XRCC4<sub>FL</sub> portent un Tag 6His. Une liaison étroite est obtenue lorsque trois groupes Ni-NTA adjacents se lient à une étiquette 6His. La présence du tag 6His sur les deux protéines nous pousse à mettre en place un protocole de marquage non conventionnel. Dans un premier temps nous avons marqué les filaments XRCC4<sub>FL</sub> seuls pour déterminer l'accessibilité et la spécificté du marquage au tag 6His. Nous mélangeons un volume de 5  $\mu$ l de X4<sub>FL</sub> à 14  $\mu$ M avec 5  $\mu$ l de billes d'or Ni-NTA à 0,5  $\mu$ M dans le tampon A. Nous avons choisi de travailler en excès de protéines (28 fois plus que de billes d'or) même si cela suppose que toutes les protéines ne seront pas marquées. Dans un deuxième temps pour l'étude des filaments mixtes, nous avons marqué XLF avec les billes d'or avant de réaliser des filaments avec un mélange de XRCC4 et XLF. XLF<sub>FL</sub> à 14µM est incubé avec 0,5 µM de billes d'or. Les protéines XLF marquées aux billes d'or sont purifiées sur une colonne Superdex 200. Ainsi l'excès des particules d'or (non fixé à XLF) est éliminé par chromatographie sur gel filtration (voir plus loin le principe). 1 µM de XLF<sub>FL</sub> marquées est ensuite incubé avec 1 µM de XRCC4<sub>FL</sub> dans le tampon A pour obtenir des filaments XRCC4-XLF. Pour chaque condition, une goutte de 5 µl d'échantillon est déposée pour réaliser une coloration positive et les observations sont réalisées en fond noir et en fond clair respectivement. Les protéines possèdant le Tag 6His sont marquées avec les billes d'or et peuvent être clairement visualisées par microscopie électronique.

# II-2- Analyses biochimiques et biophysiques

Des essais de chromatographie d'exclusion stérique couplée à l'électrophorèse dans des conditions dénaturantes (SDS PAGE) sont réalisés au laboratoire de JB. Charbonnier dans

le but de caractériser l'interaction de  $XRCC4_{FL}$  avec  $XLF_{FL}$ . La chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer les protéines seules et les complexes protéiques. L'analyse des fractions d'élution par SDS PAGE permet de caractériser les protéines existantes dans les complexes protéiques obtenus.

# a- Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC pour Size Exclusion Chromatography) est une méthode de chromatographie en phase liquide qui permet de séparer les macromolécules en fonction de leur taille et leur forme. Ce type de chromatographie est encore appelé : tamissage moléculaire ou gel-filtration. Les molécules sont entraînées par la phase mobile à travers la phase stationnaire constituée de grains poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et éluées en premier dans le volume mort (V<sub>0</sub>). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. La colonne est reliée à un détecteur qui mesure l'absorbance des fractions d'élution pour tracer le profil d'élution pour chaque échantillon (chromatographe) (figure 29).



Figure 29: Principe de la séparation des macromolécules sur une colonne d'exclusion de taille

Pour relier le volume d'élution au poids moléculaire, il est nécessaire de calibrer la colonne avec des étalons de poids moléculaire connus. Différentes protéines commerciales sont utilisées pour calibrer la colonne superdex 200 (HR 10/300 GL, capacité 24 ml, GE Healthcare) incluant l'ovalbumine 44 kDa, la conalbumine 75 kDa, l'aldolase 158 kDa, la ferritine 440 kDa, la thyroglobuline 669 kDa et le bleu dextran > 2 KDa. Après calibration, les échantillons sont chargés séparément sur la colonne superdex 200 (6 nmoles  $XLF_{FL}$ , 15 nmoles  $XRCC4_{FL}$ , un mélange de 15 nmoles XRCC4 et 3 nmoles XLF). Les échantillons sont élués. Une étape de lavage et d'équilibrage de la colonne est réalisée avec 125 ml de tampon A (Tris HCl 10 mM pH 8 NaCl 150 mM). Les protéines sont collectées par fraction de 0,05 ml et analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes.

# b- Electrophorèse en conditions dénaturantes

L'électrophorèse SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est une technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (présence de SDS et de 2- $\beta$ -mercaptoéthanol). Le gel de polyacrylamide est créé par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide, en présence d'agents de polymérisation (TEMED, APS). Plus la concentration en acrylamide est élevée, plus les pores seront petits et plus les molécules seront freinées dans le gel. Avant le dépôt sur gel, les échantillons protéiques sont dénaturés à 95°C dans un tampon contenant du SDS et du 2- $\beta$ -mercaptoéthanol. Le SDS est un détergent fort possédant une longue queue hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. Le 2 $\beta$ -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures dans une protéine. En présence de SDS, les protéines auront une charge négative apparente, elles migreront donc toutes vers l'anode. Cela signifie que seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation.

4  $\mu$ l d'échantillons XRCC4<sub>FL</sub>, XLF<sub>FL</sub> ou le mélange XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> (fractions collectées précédemment sur chromatographie) sont mélangés avec 1  $\mu$ l de tampon 5X (75 mM Tris HCl pH 6,8, SDS 2%, Glycérol 10%, 2  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,1%) et incubé 5 min à 95°C avant de les charger sur le gel. Après migration à 35 mA, le gel est coloré avec du bleu de coomassie toute la nuit sous agitation. Le gel est ensuite rincé avec une solution éthanol 10 % et acide acétique 10 % avant de le scanner.

c- Electrophorèse dans des conditions non dénaturantes (Natives)

L'électrophorèse en conditions non dénaturantes se fait en absence de SDS et  $\beta$ mercaptoethanol, et elle permet de séparer les protéines en conservant leur structure "native" (structure tertiaire, quaternaire). Les protéines sont séparées sur la base du rapport charge/masse de ce fait cette approche ne fournie pas de mesure directe du poids moléculaire. Le gel natif est préparé avec un tampon et un pH choisi en fonction de point isoélectrique (pI) de la protéine. XRCC4 et XLF ont un pI de 4,7 et 5,16 respectivement. Le pH choisi est supérieur aux pIs des deux protéines et dans ce cas les protéines ont une charge globale négative et migre ainsi du haut (l'anode, chargé négativement) vers le bas (la cathode, chargé positivement).

Contrairement au SDS PAGE, la migration sur gel natif permet de séparer les protéines de poids moléculaires identiques. L'interprétation des gels natifs est plus complexe que l'interprétation des gels SDS-PAGE. Les différences de mobilité relative peuvent refléter des différences de charge, de masse ou les deux. Un gradient est nécessaire pour augmenter la résolution du gel : les complexes sont arrêtés lorsque les mailles du gel sont "plus petites que leur taille". En fonction des complexes natifs à séparer on ajuste le gradient. Dans le laboratoire on utilise des gels commerciaux d à gradient 4-16% NativePAGE Bis-Tris HCIHCIGels (Thermo Fisher Scientific).

Cette approche peut être utilisée pour caractériser la présence de l'interaction entre XRCC4<sub>FL</sub> et XLF. 3,4 $\mu$ g de XRCC4 et 2,8  $\mu$ g de XLF sont préparés dans le tampon A et incubés 30 min à TA. Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel natif PAGE Bis Tris HClHClGel à gradient 4-16% (Thermo Fisher Scientific). La migration se fait dans un tampon 50 mM Bis tris, 50 mM tricine pH 6,8 pendant 3h à 150 V. A la fin de la migration le gel est coloré avec du bleu de coomassie.

## d- Titration Calorimétrique Isotherme (ITC)

La titration calorimétrique isotherme (ITC) est une technique utilisée pour l'étude quantitative d'interactions entre les biomolécules. Elle repose sur le fait que toute réaction chimique implique une variation d'énergie, généralement accompagnée d'une libération (exothermique) ou absorption (endothermique) de chaleur. La mesure du transfert thermique durant la liaison permet une détermination précise de la constante de liaison (K<sub>D</sub>), de la stœchiométrie (n), de l'enthalpie ( $\Delta$ H) et de l'entropie ( $\Delta$ S) d'une réaction en solution. Le microcalorimètre comporte deux cellules, l'une contient de l'eau et sert de cellule de référence, l'autre contient une des protéines à étudier (récepteur). La deuxième protéine à caractériser (le ligand) est chargée dans une seringue placée dans un dispositif d'injection. Le dispositif d'injection est inséré dans la cellule d'échantillon contenant la protéine étudiée (figure 30 a). De petits aliquots de ligand sont injectés dans la solution de protéine. Si le ligand se lie à la protéine, des variations de chaleur de quelques millionièmes de degrés Celsius sont détectées et mesurées. Les dispositifs de détection de la chaleur détectent la différence de température entre les cellules lors de la formation de la liaison et fournissent un retour aux dispositifs de chauffage, qui compensent cette différence pour ramener les cellules à la même température. La quantité de chaleur mesurée est directement proportionnelle au nombre de liaisons. Au début de la titration, la majorité des récepteurs sont libres et les protéines ligands injectées se fixent sur le récepteur. Des pics d'échange de chaleur sont enregistrés à chaque injection. Progressivement l'injection en ligand sature le récepteur et la taille du pic de la chaleur mesurée diminue (figure 30 b).



Figure 30: Principe de la calorimétrie

Cette approche est utilisée au laboratoire de J.B. Charbonnier pour l'étude de l'interaction entre XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub>. XRCC4<sub>FL</sub> est déposée dans la cellule de l'échantillon à une concentration de 10-20  $\mu$ M et XLF<sub>FL</sub> est chargé dans une seringue à une concentration de 100-200  $\mu$ M et injecté dans la cellule de l'échantillon (thèse J. Amram, 2015).

L'énergie dégagée par l'interaction est enregistrée en fonction du temps puis intégrée par le logiciel Origin 7.0 (MicroCal). L'isotherme de titration qui s'ajuste sur la courbe expérimentale permet de déterminer la variation d'enthalpie de la liaison,  $\Delta H^{\circ}$  (kcal/mol),

la constante d'association Ka ( $M^{-1}$ ) ainsi que la stœchiométrie d'interaction (n) (figure 30 c). Les autres paramètres thermodynamiques, à savoir les variations d'entropie ( $\Delta S^{\circ}$ ) et d'enthalpie libre ( $\Delta G^{\circ}$ ) ainsi que la constante de dissociation (Kd) peuvent être déduits des relations :

 $\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ} = -RT \ln (Ka) = RT \ln (Kd)$  avec T (K) la température absolue et R la constante des gaz parfaits, 8.314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>.

L'énergie libre  $\Delta G^{\circ}$  est donc la résultante de deux contributions énergétiques (i) une contribution enthalpie reflétant principalement des liaisons hydrogènes et des interactions de Van der Waals; (ii) Une contribution entropique reflétant principalement les interactions hydrophobes, des changements conformationnelles dus à l'interaction ainsi que le relargage de molécules d'eau ou d'ions du fait de l'interaction (thèse J. Amram, 2015).

# II-3- La structure du filament XRCC4<sub>FL</sub>

Pour déterminer la structure des filaments XRCC4, nous avons travaillé en collaboration avec le professeur Edward H Egelman de l'Université de Virginie (USA), spécialiste de la reconstruction des filaments hélicoïdaux. Il a développé des algorithmes spécifiques et il a résolu les structures hélicoïdales de filaments tels que Rad51, RecA, ou encore des filaments d'actine.

# a- Introduction et principe de la méthode

Pendant 30 ans ce sont les méthodes de Fourrier-Bessel qui ont permis la reconstruction tridimensionnelle des filaments et des tubes hélicoïdaux (418)(419). Depuis ces 10 dernières années, des méthodes dérivées des algorithmes de reconstruction de particules isolées ont émergés pour reconstruire ces filaments hélicoïdaux. L'approche IHRSR (*IterativeHelical Real Space Reconstruction*) que nous avons utilisée émane directement de ce principe. Edward Egelman a développé cette méthode pour reconstruire des filaments flexibles (RecA, RAD51, Actine..) (420)(421).

La flexibilité des filaments est naturellement présente dans de nombreux polymères et elle peut être la principale limitation dans l'analyse par la méthode de Fourrier-Bessel, car elle est à l'origine de désordre. Dans un polymère hélicoïdal, il n'y a ni forces ni facteurs qui maintiennent l'ordre sur de longue distance. Toutes les interactions sont locales et les variations de ces interactions locales peuvent provoquer un désordre de second type. La méthode IHRSR peut être utilisée pour comprendre les variations qui surviennent dans un filament et fournir des informations intéressantes sur la dynamique du filament et la fonction de ce désordre. Il devient possible de définir des variations dans le « twist » (rotation entre les sous-unités) et le pas axial (axial rise). L'autre force de cette approche c'est de pouvoir séparer l'hétérogénéité à l'intérieur des filaments et l'hétérogénéité entre filaments. Un volume de référence (figure 31) est utilisé pour générer des projections en 2 dimensions de référence.



#### Figure 31: Le principe de la méthode IHRSR

Une structure de référence (en haut du diagramme) est utilisée pour déterminer l'orientation azimutale, la rotation dans le plan et la translation dans le plan de chaque segment d'image. Dans cet exemple, la structure de référence est tournée par incréments de 4°. L'incrément azimutal réel  $\alpha$  sera déterminé par la résolution (d) et le diamètre du filament (D),  $\alpha < 57,3$  \* dl D. Une reconstruction tridimensionnelle est générée par rétroprojection à partir des images alignées en utilisant l'attribution angulaire azimutale. Cette symétrie est ensuite imposée, générant un nouveau volume de référence (en haut du diagramme). La procédure est autorisée à faire un cycle jusqu'à ce qu'il n'y ait aucun changement dans la symétrie hélicoïdale. La procédure est insensible au choix d'un volume de référence initial, et un cylindre plein peut être utilisé comme référence initiale. d'après (421).

Chaque projection est en fait une projection du volume auquel on a appliqué une rotation azimutale  $\Delta \phi$  (figure 32). L'incrément angulaire entre les projections dépend du diamètre de l'objet et de la résolution attendue dans la reconstruction finale. Les projections de référence sont ensuite corrélées contre plus de 10000 images de segments des filaments que l'on cherche à reconstruire. L'alignement va permettre de générer une première reconstruction 3D (en bas à gauche figure 31) auquel on impose une symétrie hélicoïdale pour générer un nouveau volume de référence (en haut figure 31) pour un nouveau cycle de procédure. Dans cette méthodologie, il n'est pas nécessaire d'avoir une connaissance antérieure de la structure. En fait, on commence toujours avec un cylindre solide comme première référence. Cette méthode ne nécessite pas de connaitre le volume de référence, par contre cette méthode nécessite une certaine estimation de la symétrie hélicoïdale et pour cela il faut une résolution importante pour la déterminer à l'aide des spectres de puissance moyen ou utiliser une autre méthode pour définir la symétrie. Nous verrons que dans notre cas nous avons été amenés à définir cette symétrie en utilisant la microscopie de force atomique et l'ombrage métallique en MET.

Dans cette méthode la première question pratique concerne la longueur optimale de la boite que l'on utilise pour découper les filaments dans l'image (figure 32 a) et quel est le chevauchement autorisé entre deux boites adjacentes.



*Figure 32: Représentation schématique des paramètres d'une hélice* a : Image MET (Coloration négative) d'un filament. Les boites en rouge : segment de filament droit. b : paramètres de l'hélice.

En fait c'est principalement la flexibilité et parfois la courbure du polymère étudié que l'on peut moyenner par la valeur de la longueur de persistence, qui conditionne la longueur de la boite. Si la boite est trop longue, la flexibilité à l'intérieur du segment va dégrader la résolution. Cette longueur est donc définie empiriquement pour chaque échantillon. Il n'y a aucune relation entre la longueur de la boite et la notion classique de la répétition hélicoïdale. Cette répétition est définie comme la distance nécessaire pour qu'une sous-

unité translate le long de l'axe. Cette répétition doit être le produit du nombre de sous-unité (m) par la distance axiale de la translation d'une sous-unité ( $\Delta z$ ). Il faut noter qu'un changement infinitésimal dans la torsion donne lieu à un changement catastrophique dans la distance de répétition. Ainsi si le filament présente des variations de torsion cela va entrainer des variations importantes dans le pas. La longueur de la boite doit être en générale 3 ou 4 fois plus importante que le  $\Delta z$  quelque soit le nombre de sous-unité par tours.

Le chevauchement optimal des boites dépend du  $\Delta z$  puisqu'elle doit être égale à au moins la moitié du  $\Delta z$ . Les boites adjacentes peuvent se chevaucher, il est juste nécessaire que ces deux boîtes adjacentes ne soient pas traduites dans la procédure d'alignement et de reconstruction du programme par la même vue de l'hélice.

# b- Caractérisation de la chiralité du filament XRCC4

La chiralité du filament hélicoïdale  $XRCC4_{FL}$  (le sens de l'hélice gauche ou droite) est déterminé en utilisant des approches comme la microscopie à force atomique (AFM) et la MET (l'ombrage métallique).

#### *b1-Détermination de la chiralité en MET par ombrage métallique*

Il est possible d'obtenir des images topographiques en MET en utilisant une technique particulière de préparation d'échantillon que l'on appelle l'ombrage par métaux lourds. Cette technique consiste à vaporiser une fine couche de métal (du platine, de l'or, du tantale ou du tungstène) sur l'échantillon absorbé sur une grille de microscopie incliné suivant un angle pouvant varié entre 30° et 5°. On peut réaliser un ombrage bidirectionnel (on ombre l'échantillon suivant deux directions) ou rotatif (on fait tourner l'échantillon). La technique d'ombrage utilisée a été mise au point au laboratoire et permet d'obtenir un ombrage très fin à savoir un ombrage rotatif à grand angle (6°) d'un mélange tantale-tungstène.

### b2- Détermination de la chiralité par microscopie à force atomique (AFM)

 $1\mu$ M de XRCC4 est préparé dans le tampon A (Tris HCl 10 mM pH 8 NaCl 150 mM). Initialement, on dépose  $5\mu$ l de spermidine à 100  $\mu$ M sur la feuille de mica fraichement clivée et on laisse incubé 1 min à TA, l'excès de la solution est ensuite absorbé avec un papier filtre sans cendre (412). Un volume de  $5\mu$ l d'échantillon est déposé sur le mica fonctionnalisé, ensuite incubé 1 min. Quelques gouttes d'acétate d'uranyle 0,2 % sont déposées en inclinant le mica, cela permet d'améliorer l'étalement des molécules. Le mica est séché par absorption du liquide sur du papier filtre sans cendre. Les échantillons sont conservés dans l'étuve à 37°C avant leurs observations en AFM à l'air.

L'imagerie AFM a été réalisée en mode contact intermittent sur un système multimode (Bruker) fonctionnant avec un contrôleur Nanoscope V (Bruker). Nous avons utilisé des cantilevers de silicium AC200TS (Olympus) avec des fréquences de résonance de ~ 150 kHz. Toutes les images ont été acquises à une fréquence de balayage de 1 Hz et une résolution de 1024 X 1024 pixels. Les images ont été analysées dans le logiciel Nanoscope V et une fonction polynomiale d'ordre 3 est utilisée pour supprimer le fond continu. Une correction de planéité (flatten) est effectuée sur toutes les images brutes avec le logiciel du Nanoscope. Les images obtenues en AFM sont analysées par image J.

# c- La caractérisation en Cryo-EM des filaments

La cryo-EM est de plus en plus utilisé pour caractériser de la structure des protéines. En utilisant cette approche on s'affranchit de la présence de colorant ou de fixateur chimique. Cette technique consiste à congeler très rapidement des échantillons biologiques conservant ainsi leur état natif dans une glace amorphe c'est-à-dire non cristalline. Les avancé technologique (plongeur automatique), le développement de nouveau algorithme de traitement d'images ont permit d'obtenir des structures 3D à une résolution (3-4 Å) proches de celles obtenues en cristallographie (422)(423). Dans cette partie du projet autre que la collaboration avec E. Egelman, on a engagé une collaboration avec G. Pehau-Arnaudet de l'Institut Pasteur. Ils sont équipés d'un plongeur de vitrification automatique (Leica) et d'un microscope électronique à transmission FEI Tecnai F20 (200kV), équipé d'un canon à émission de champ (FEG). Il est dédié à la cryo-microscope électronique et à la cryo-tomographie électronique.

## c1-Effluvage par plasma des grilles

Les grilles que nous utilisons sont des grilles commerciales Lacey Film (Oxford). Elles sont fonctionnalisées (rendre la surface hydrophile) en utilisant le même procédé que la coloration négative, « glow descharge »

# c2- La Cryo-fixation (vitrification de l'échantillon)

XRCC4<sub>FL</sub> à  $86\mu$ M est dilué au  $10^{eme}$  dans le tampon A et un volume de  $4\mu$ l d'échantillon est déposé sur la grille. Cette dernière est placée au bout d'une pince et mise en place sur le plongeur automatique Leica. La température de la chambre de dépôt d'échantillon sur la

grille et le taux de l'humidité sont réglés sur 20°C et 90% respectivement. L'excès de la solution est absorbé avec un papier absorbant ; cette étape est connue sous le nom « blot ». L'étape d'épongeage dure 0,8 s, cette condition nous permet d'avoir une bonne épaisseur de glace dans laquelle les filaments sont piègés.

### c3- Cryo-transfert de l'échantillon

L'échantillon est transféré dans un porte-objet cryo. Le transfert doit se faire dans les vapeurs d'azote liquide et nécessite l'utilisation d'un système spécifique (voir introduction chapitre IV).

#### c4-L'observation en mode Low dose

L'échantillon est introduit à l'aide du porte-objet cryo dans la colonne sous vide du microscope refroidi à l'azote liquide. Les échantillons sont observés en mode d'illumination à faible dose d'électron (inférieur à 10 électrons/Å<sup>2</sup>). Les images sont prises à un défocus de -3 $\mu$ m de et un grandissemnt de 50000.

# III- Formation et études des complexes nucléoprotéiques

Les interactions ADN-protéine jouent un rôle clés dans plusieurs processus et fonctions cellulaires, y compris la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Identifier et examiner la nature de ces interactions est essentiel pour comprendre les bases moléculaires de la mise en place de ces processus. Plusieurs approches biochimiques et biophysiques sont utilisées *in vitro* pour caractériser ces interactions, incluant le retard sur gel, le foot print et le Résonance Plasmonique de Surface (SPR: Surface Plasmon Resonance), le southwestern blot, le test simple hybride, le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Des approches de biologie structurale comme la Diffusion des Rayons X aux petits angles (SAXS), la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la Cristallographie aux rayons X permettent de définir la nature des interactions à haute résolution. La spécificité et l'affinité des interactions entre l'ADN et les protéines sont définies par la constante de dissociation à l'équilibre (K<sub>d</sub>). Le K<sub>d</sub> est le rapport entre la constante cinétique d'association (kon) et la constante cinétique de dissociation (koff). Plus la valeur du K<sub>d</sub> est basse, plus l'affinité de liaison entre le ligand et sa cible est élevée. L'affinité de liaison est influencée par les interactions non covalentes entre biomolécules, telles que les liaisons

hydrogènes, les interactions électrostatiques et hydrophobes et les forces de Van der Waals entre les deux molécules.

Pour caractériser les interactions entre les partenaires de la voie NHEJ et l'ADN, j'ai utilisé différentes approches incluant le retard sur gel (EMSA : electrophoretic mobility shift assay), la microscopie électronique à transmission (coloration positive) et la microscopie à force atomique. La première étape dans ce travail est la purification des substrats d'ADN qui seront utilisés dans les différentes expériences.

# III-1- Synthèse et purification des substrats d'ADN

Lors de mon travail de thèse j'ai utilisé des fragments d'ADN de différentes tailles. Les fragments 200 pb, 500 pb, 600 pb, 800 pb et 1440 pb sont générés par PCR (Polymerase Chain Reaction) et purifiés sur chromatographie échangeuse d'ions.

# a- PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*, elle permet de produire plusieurs exemplaires d'un fragment d'ADN particulier (séquence d'intérêt). Dans une réaction de PCR, la polymérase réplique les fragments d'ADN en présence du tampon approprié, d'un mélange équimolaire des quatre désoxyribonucléotides dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), d'une paire d'amorce (oligonucléotides) et d'un ADN matrice.

Pour chaque fragment à purifier je prépare 1 ml de réaction qui contient du tampon Taq LongAmp1X, 400  $\mu$ M dNTP, 1,6  $\mu$ M de chaque amorce, 0,1 $\mu$ g/ml d'ADN matrice (pBR322), 50 unités de la polymérase Taq LongAmp (0,05 U/ $\mu$ l), qui est un mélange de la Taq polymérase et de la Deep vent polymerase

	Ci	C <sub>f</sub>	V
Tampon LongAmp Taq	5X	1X	200 µl
Dntp	10 mM	400 μΜ	40 µl
Amorce 1	200 µM	1,6 µM	8 µl
Amorce 2	200 µM	1,6 µM	8 µl
ADN matrice (pBR322)	50 µg/ml	0,1 µg/ml	2 µl
Polymérase LongAmp	2.5 U/µl	50 U	20 µl
H2O qsq 1000 µl			722 µl

Tableau 1: récapitulatif des réactifs utilisés en PCR avec la taq polymérase ou la longAmp  $C_i$ : concentration initiale,  $C_f$ : Concentration finale, V: volume, U : unité

Pour obtenir les différents fragments d'ADN, le vecteur pBR322 et différentes paires d'amorces sont utilisés et résumé dans le tableau en annexe 1. Certaines amorces présentes des modifications au niveau de l'extrémité incluant un marquage au Cy5, une biotine, on verra plus loin l'utilité de ces modifications.

La réaction PCR est répartie sur des tubes de 0,2 ml (50 µl/tube) et placé dans l'appareil à PCR (PCR Thermocycler eppendorf) avec les conditions appropriées pour l'amplification de chaque fragment. Plusieurs paramètres sont programmés dans l'appareil à savoir le nombre de cycle, la température et le temps des étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation pour chaque cycle. La dénaturation est réalisée à 94°C/30s, elle permet la dissociation de deux brins d'ADN matrice. L'hybridation se fait à une température Ta (annealing temperature) qui dépend de la séquence des amorces (%GC), cette étape permet l'appariement amorces/matrice. L'élongation est l'étape de synthèse d'ADN par la polymérase, la température est la température optimale pour la fonction de la polymérase utilisée, le temps dépend de la vitesse de synthèse et la longueur du fragment d'ADN à amplifier. Voir l'annexe 2 pour plus de détails sur les paramètres de PCR pour chaque fragment.

### b- Analyse d'ADN en électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose TBE 0,5 X (45 mM Tris HCl Borate, 1 mM EDTA, pH 8,2), le pourcentage d'agarose dans le gel dépend de la taille des fragments d'ADN à analyser. Les molécules d'ADN sont chargées négativement (groupement phosphate) quand elles sont soumises à un champ électrique elles migrent vers l'anode. La migration des fragments d'ADN double-brins linéaires dépend de leurs

tailles, ainsi plus le fragment est petit et plus il migre rapidement. Avant le chargement sur gel, 1µl du produit PCR obtenu précédemment est dilué dans 4 µl de tampon TE (10 mM Tris HClHClpH 8, 1 mM EDTA) et supplémenté de 1 µl de tampon de charge 6X (0,03% bleu de bromophénol, 0,03% xylène cyanol, 60 mM EDTA, 60% glycérol). Le bleu de bromophénol est utilisé comme marqueur de migration. Comme pour l'ADN, le bleu bromophénol est chargé négativement et migre dans la même direction que l'ADN ce qui nous permet de suivre la migration. Le glycérol augmente la densité des échantillons de ce fait ils peuvent être déposé à l'aide d'une micropipette dans les puits du gel d'agarose submergés dans la solution de migration TBE 0,5X. Une fois que les échantillons et le marqueur de taille 2 Log DNA Ladder (0,1-10 Kb, NEB) sont chargés dans le gel, l'électrophorèse est réalisée dans un tampon TBE 0,5X à un voltage constant de 90 V, le temps de migration dépend de la taille des fragments d'ADN à analyser. Après migration le gel est coloré en l'incubant sous agitation dans une solution TBE 0,5X contenant du Sybr Gold (Thermo Fisher Scientific) (le Sybr est dilué au 10000<sup>e</sup> dans TBE 0,5X). Le Sybr Gold se lie directement aux acides nucléiques, c'est un marqueur aspécifique de séquence. Le Sybr Gold est un colorant fluorescent, la présence d'ADN est révélée par excitation par illumination UV (300 nm) en plaçant le gel sur un transilluminateur (table UV)(424).

# c- Purification des fragments d'ADN

Les produits de PCR sont purifiés par chromatographie sur une colonne échangeuse d'ions dans le système SMART (pharma biotechnology). La chromatographie échangeuse d'ions est une technique séparative, elle permet de séparer les molécules selon leurs charges nettes. J'ai utilisé pour la purification des fragments d'ADN une colonne MiniQPC 3,2 (capacité 1 ml), cette colonne est constituée d'une résine contenant des groupes fonctionnels chargés positivement (colonne échangeuse d'anions). 500 µl de produits PCR sont chargées sur la colonne préalablement équilibrée avec un tampon Tris HCl 10 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM pH 7.5 filtré et dégazé. Les fragments d'ADN (chargés négativement) se fixent à la résine (phase stationnaire) à basse force ionique (Tris HCl 10 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM pH 7.5). Ces fragments sont ensuite élués avec un tampon Tris HCl 10mM, NaCl 10mM, NaC

sont élués en premier suivit des fragments plus longs en fonction de la concentration en sel monovalent croissante. Le système est équipé d'un détecteur qui mesure l'absorbance à différentes longueurs d'ondes 230 nm, 260 nm et 280 nm. Le détecteur est couplé à un enregistreur du signal émi, ce qui nous fournie le chromatogramme. Les fractions sont collectées et l'amplitude des pics ainsi que leurs aires permettent de mesurer la quantité de l'ADN.

## d- Précipitation et quantification d'ADN

L'ADN étant récupéré à haute force ionique, il est concentré et dessalé par précipitation à l'éthanol. Pour un volume donné de l'échantillon V<sub>i</sub> on rajoute 1/10 du volume en acétate de sodium 3 M pH 5.2 ( $C_f$ = 0,3 M) et 2 fois le volume d'éthanol 100% froid. Le mélange est incubé toute la nuit à -20°C. L'échantillon est centrifugé 30 min à 13200 rpm à 4°C. Le culot est ensuite lavé avec 1 ml d'éthanol 70% (hydratation) puis centrifugé à nouveau 13200 rpm 20 min à 4°C. Le culot est séché à l'air, repris dans 30 à 100 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA), puis dosé au spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 afin de déterminer sa concentration en ng/µl. Parallèlement la pureté des échantillons est observée en mesurant l'absorption à 230 nm, 260 nm et 280 nm, plus précisement avec le ratio A260 nm/A280 nm qui doit être de l'ordre de 1,8. L'absorbance à 230 nm permet d'avoir une information sur la pureté de la solution. L'homogénéité de la taille des fragments d'ADN est vérifiée en MET (coloration positive).

# III-2- Caractérisation des interactions ADN protéines

# a- Retard sur gel (EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay)

#### *la-principe de la méthode*

Le retard sur gel est une des techniques utilisée pour caractériser les complexes ADNprotéines (425). Initialement cette approche a été utilisée pour détecter les facteurs de transcription se liant à des séquences spécifiques d'ADN (426). Elle est simple et rapide basée sur l'analyse du changement de mobilité électrophorétique de l'ADN en présence de protéine (425). La présence de la protéine ralenti la migration de l'ADN ce qui permet la séparation de l'ADN libre de l'ADN lié grâce à leurs différences de mobilité sur un gel d'électrophorèse. Si plusieurs protéines se fixent à l'ADN on observera plusieurs bandes. Depuis les années 80 de nombreuses améliorations ont été apportées à cette approche pour augmenter sa sensibilité et sa spécificité. Le marquage de l'extrémité 5 'ou 3' des acides nucléiques avec un radio-isotope <sup>32</sup>P a été largement utilisé pour sa grande sensibilité (427). Maintenant on utilise majoritairement marquage covalent de l'acide nucléique avec un fluorophore (428). Concernant les interactions ADN-protéines, il est possible d'étudier la stoechiométrie des complexes ADN-protéine, l'affinité relative d'une protéine pour différents substrats (429). Il faut noter que lorqu'une protéine P, se lie à un site unique sur une molécule d'ADN, D, on aura un complexe PD, en équilibre avec les composants libres :

$$\mathbf{P} + \mathbf{D} \stackrel{\mathbf{k}_{a}}{\underset{\mathbf{k}_{d}}{\overset{\mathbf{P}}{\overset{\mathbf{D}}{\overset{\mathbf{D}}{\overset{\mathbf{C}}}{\overset{\mathbf{C}}}{\overset{\mathbf{C}}{\overset{\mathbf{C}}}{\overset{\mathbf{C}}{\overset{\mathbf{C}}}{\overset{\mathbf{C}}{\overset{\mathbf{C}}}}}{\overset{\mathbf{C}}{\overset{\mathcal{C}}}{\overset{\mathcal{C}}{\overset{\mathcal{C}}{$$

Ka: taux d'association, Kd: taux de dissociation

Ce qui est étonnant et à rappeler dans les expériences de gel retard, c'est que l'équilibre est déplacé dès les premières minutes de migration puisque seuls l'ADN libre ou lié migre alors que les protéines libres ne le font pas. A priori, on ne verrait que des complexes très très stables, ce qui n'est pas toujours le cas. Pour expliquer de paradoxe, l'effet cage dans les mailles du gel ou séquestration moléculaire permettent aux protéines dissociées d'être piégées dans la maille et de revenir sur leur substrat ADN, ce qui favorise ainsi une reformation du complexe PD (430) (431).

#### a2- Etude de l'interaction entre XRCC4, XLF et l'ADN

L'interaction de XRCC4 et XLF avec l'ADN est caractérisée initialement sur gel retard. Les complexes ADN-protéine sont réalisés dans un volume final de 10 µl dans un tampon 10mM Tris-HCl pH 8, NaCl 150mM. Une gamme de concentration (0.5 µM, 2 µM et 4 µM) est testée pour XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> seuls, dans le mélange équimolaire de XRCC4 et XLF on teste les concentrations suivantes 0.5 µM, 2 µM et 4 µM pour chaque protéine. Les protéines sont incubées avec 3 nM molécules d'ADN double brin linéaire 1440 pb. Après incubation 30 min à 25°C, on ajoute 2 µl de tampon de charge (6X) et on charge les échantillons sur un gel d'agarose 0,8% TBE 0,5X. La migration s'effectue dans un tampon TBE 0,5X à 90 V pendant 45 min. A la fin de la migration, le gel est coloré avec du Sybr Gold comme décrit précédemment.

# a3- Etude de l'interaction entre l'hétérodimère Ku70/Ku80 et l'ADN

Pour l'étude de l'interaction entre Ku70/Ku80 et l'ADN, j'ai utilisé un fragment d'ADN 200 pb marqué Cy5. Les complexes ADN-protéines sont réalisés dans un tampon réactionnel Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 50 mM dans un volume final de 10 µl. L'hétérodimère Ku à différentes concentrations (0, 8, 16, 32, 64, 128 et 256 nM) est incubé toujours avec une concentration fixe en molécules d'ADN de 7,5 nM molécules, ce qui implique que les complexes se sont formés à différents ratio molaire extrémités d'ADN/protéine. Le mélange réactionnel est ensuite incubé 5 min ou 15 mn à 25°C à l'abri de la lumière. Après incubation on ajoute 2 µl de tampon de charge (Orange G de chez Sigma) et l'ensemble est déposé sur gels d'agarose D5 0,6 ou 0,8 % TBE 0,5X. La migration se fait à TA dans un tampon TBE 0,5X à 56mA/30 min. L'ADN marqué cy5 est révélé à l'aide d'un phosphoimageur Typhoon 7000 Fla.

## b- Microscopie électronique à transmission (coloration positive)

# *b1-Protocole de la coloration positive*

Les étapes de préparation de carbone, préparation des grilles, d'ionisation des grilles et de coloration positive sont les mêmes que celle décrites précédemment pour l'étude des complexes protéiques. La différence réside dans l'étape de préparation d'échantillons, dans ces études on forme des complexes nucléoprotéiques avant le dépot.

#### b2- Etude de l'interaction de XRCC4 avec l'ADN

Initialement, XRCC4<sub>FL</sub> à 250 nM est incubé 30 min à  $37^{\circ}$ C avant son utilisation pour former des complexes.

- L'ADN double brin linéaire 1440 pb à 0,5 nM molécules est incubé avec 50 nM de  $XRCC4_{FL}$  (préalablement incubé à 37°C) dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 150 mM. Après 30 min d'incubation à 37°C, 5 µl d'échantillon sont déposés sur une grille, contrastés en coloration positive puis observés en mode fond noir annulaire.

- XRCC4<sub>FL</sub> à 50 nM (préalablement incubé à 37°C) est incubée avec 0.29 nM molécules d'ADN superenroulé négativement pUC19 dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 150 mM. Après 30 min d'incubation à 37°C, 5  $\mu$ l d'échantillon sont déposés sur une grille, contrastés avec la méthode de coloration positive puis observés en mode fond noir.

#### *b3- Etude de l'interaction de XLF avec l'ADN*

XLF à 50 nM est incubé avec l'ADN double brin linéaire 1440 pb à 0.5 nM molécules dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 150 mM. Après 30 min d'incubation à 37°C, 5 μl d'échantillon sont déposés sur une grille, contrastés avec la méthode de coloration positive puis observés en mode fond noir.

# b4- Etude de l'interaction du complexe XRCC4-Ligase IV avec l'ADN

- Le complexe XRCC4-Ligase IV dé-phosphorylé à 200 nM est incubé dans le tampon A Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 50mM avec 2,2 nM molécules pUC19 linéarisés (2686 pb) avec l'enzyme XbaI (NEB) (les fragments obtenus ont des extrémités 4nt-5' sortants). Après 30 min d'incubation à 30°C. Les échantillons sont dilués au 10<sup>eme</sup> avant le dépôt sur la grille, contrastrés avec la méthode de coloration positive. Ils sont ensuite observés en fond noir.

- Différentes concentrations du complexe XRCC4-Ligase IV (50, 100, 200 et 400 nM) sont incubées avec 3 nM molécules de plasmide pUC19 linéarisé (extrémités 5'nt sortants) pendant 30 min à 37°C dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, Mg 5 mM, ATP 1mM. Les échantillons sont dilués au 10<sup>eme</sup> avant le dépôt sur les grilles, contrastés avec la méthode coloration positive et observés en mode fond noir filtré sur le microscope Zeiss LEO 912 AB.

# b5- Etude de l'interaction de l'hétérodimère Ku70/Ku80 avec l'ADN

- Ku70/Ku80 à 50 nM est incubée avec 7,5 nM molécules d'ADN double brin linéaire 500 pb dans le tampon A Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 50 mM. Après 5 min d'incubation à 25°C, 5µl d'échantillon sont déposés sur une grille, contrastés avec la méthode de coloration positive puis observés en mode fond noir annulaire.

- Ku70/Ku80 à 24 nM est incubée avec 3 nM molécules de plasmide pUC19 linéaire avec des extrémités 5'-4 nt sortante. Après 5 min d'incubation à 25°C, 5 μl d'échantillon sont déposés sur une grille, contrastés avec la méthode de coloration positive puis observés en mode fond noir annulaire.

#### b6- Etude de l'interaction du complexe ADN-Ku avec XLF et XRCC4

#### Préparer les complexe ADNb-Ku bloqué par la streptavidine

-Dans un volume de 28 µl, 10 µM Ku70/Ku80 sont incubés avec 116 nM molécules d'ADN double brin linéaire 500pb biotinylé (ADNb). Le complexe est incubé 5 min à

 $25^{\circ}$ C dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8 NaCl 150 mM. Un volume de 8 µl de streptavidine fraîchement reconstituée pour avoir une concentration à 6 µM finale est ajouté au complexe et incubé 15 min à  $25^{\circ}$ C. Le complexe est dilué en ajoutant 14 µl de tampon (Tris HCl 10 mM pH 8 NaCl 150 mM) avant de les purifier sur une colonne type superose 6 préalablement équilibré avec un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 150 mM. Au cours de cette étape on élimine l'excès en protéines (Ku et streptavidine). L'analyse des fractions d'élution contenant les complexes ADNb-Ku bloqués par la streptavidine nous permet de sélectionner les fractions contenant des molécules d'ADN totalement couvertes par Ku.

La streptavidine interagit avec la biotine aux extrémités et empêche ainsi l'entrée ou la sortie des protéines Ku. L'interaction biotine streptavidine est la plus forte interaction biologique non covalente connue avec une constante de dissociation Kd de l'ordre de 4.10<sup>-14</sup>M. La streptavidine est une protéine purifiée à partir de la bactérie *Streptomyces avidini* alors que la biotine est une vitamine appelée vitamine B7. La streptavidine existe sous forme d'homo-tétramères. Chaque monomère a un site biotine et on a ainsi pour chaque streptavidine 4 sites biotine. Les conditions de concentration d'ADN et de streptavidine utilisées sont préalablement définies et permettent d'avoir une biotine pour chaque homo-tétramère de streptavidine.

La stabilité des complexes est étudiée en analysant les complexes au cours du temps (30 min, 24 h et 96 h) après leur préparation. Pour réaliser cette analyse nous avons choisi de compter le nombre de complexes ADN-Ku présent par  $\mu$ m<sup>2</sup> sur la grille de microscopie au cours du temps.

# Etude d'interaction du complexe ADN-Ku-streptavidine avec XLF

- Les complexes ADN-Ku-streptavidine obtenus sont incubés soit avec  $XLF_{FL}$  à 10 nM dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 50 mM. Après 15 min d'incubation à 25°C, 5  $\mu$ l d'échantillon sont déposés sur une grille et sont contrastés soit avec la méthode de coloration positive ou avec la méthode de coloration négative et ensuite sont observés en fond clair ou fond noir respectivement.

La présence de XLF dans les complexes est analysée par marquage aux billes d'or.

- Pour déterminer l'implication du domaine KBM de XLF dans ces interactions, les complexes ADN-Ku-streptavidine obtenus précédemment sont incubés avec XLF<sub>224</sub> à 10 nM dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 50 mM. Après 15 min d'incubation à 25°C, 5µl d'échantillon sont déposés sur une grille et contrastés avec la méthode de

coloration positive et sont ensuite observés en fond noir. Pour chaque condition 600 molécules sont analysées et les complexes bridgés sont quantifiés.

# c- Microscopie à force atomique

L'ADN double brin linéaire (500 pb) à 7,5 nM molécules est incubé avec 50 nM de Ku70/Ku80 dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 150 mM pendant 5 min à 25°C. Une goutte de 5 µl de spermidine à 100 µM est déposée sur la feuille de mica fraichement clivée et incubée 1 mn à TA, l'excès de la solution est ensuite adsorbé avec un papier filtre sans cendre. Une goutte de 5µl du complexe ADN-Ku est déposée sur le mica fonctionnalisé, l'échantillon est incubé 1 mn. Quelques gouttes d'acétate d'uranyle à 0,2 % sont déposées sur l'échantillon en inclinant le mica, cela permet d'améliorer l'étalement des molécules. Le mica est séché par adsorption du liquide avec du papier filtre sans cendre. Les échantillons sont conservés dans l'étuve à 37°C avant leurs analyses en AFM. Les images AFM à l'air ont été obtenues en mode contact intermittent sur un AFM Multimode de Veeco Instruments associé au contrôleur Nanoscope IIIa. Nous avons utilisé les microleviers avec une excitation en mode acoustique entre 250 et 350 kHz et une

amplitude d'oscillation de quelques nanomètres. Une correction de planéité (flatten) est effectuée sur toutes les images brutes avec le logiciel du Nanoscope. Les images obtenues en AFM sont analysées par image J.

# C- Résultats et discussions

# I- Caractérisation de XRCC4 et XLF

# I-1- Rappel des résultats obtenus avec les formes tronquées

La caractérisation de la structure cristallographique des partenaires de la Ligase IV à savoir les protéines XRCC4 et XLF a fait l'objet de plusieurs études. A ce jour il n'existe aucune structure des protéines entières et nous disposons uniquement de la structure cristallographique des formes tronquées de XRCC4 et XLF: soit les formes XRCC4 (1-157) dépourvues du domaine d'interaction avec la Ligase IV (154-188) et du domaine Cterminal (C-ter), soit les formes XRCC4 (1-203) dépourvues du domaine C-ter (354) et les formes XLF (1-224) (375) ou XLF (1-233) (372) dépourvu du domaine C-ter. Les analyses de ces structures cristallographiques montrent que ces deux protéines présentent une forte similarité de structure (95%) malgré une faible homologie de séquence (13,7%)(155). Chaque monomère de protéine est constitué d'un domaine N-terminal (N-ter) globulaire suivi d'un domaine Coiled-Coil et d'un domaine C-ter non structuré. La structure cristallographique de ces protéines tronquées montre qu'elles existent sous forme de dimère (354)(373).

Une collaboration entre le laboratoire de Jean Baptiste Charbonnier (I2BC, Paris Saclay) et le laboratoire d'Eric Le Cam (Gustave Roussy, Villejuif) a permis de proposer une structure qui combine des données cristallographiques et de Microscopie Electronique d'un complexe XRCC4 tronqué-XLF tronqué. Dans cette étude les formes tronquées XRCC4 (1-157) (XRCC4<sub>157</sub>) et XLF (1-224) (XLF<sub>224</sub>) sont utilisées (figure 33a). Des cristaux ont été obtenus en utilisant un mélange équimolaire de XRCC4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub>. L'unité asymétrique du cristal contient un tétramère composé de deux homo-dimères de XRCC4<sub>157</sub> (bleu foncé et bleu clair) et de deux homo-dimères de XLF<sub>224</sub> (vert foncé et vert clair) qui interagissent principalement par leurs domaines N-terminaux (figure 33b). Ces résultats sont cohérents avec des études de mutagenèses dirigées qui révèlent que des résidus de XRCC4 et XLF situés dans le domaine N-ter des deux protéines sont importants pour leurs interactions (17)(374).

Chaque homo-dimère de XRCC4<sub>157</sub> interagit avec un homo-dimère de XLF<sub>224</sub> à travers une interface principale "i1" (il-A et il-B (cercles noirs)) au niveau de la tête globulaire. L'analyse de l'empilement dans le cristal montre deux interfaces secondaires ("c2" et "c3") entre les domaines Coiled-Coil des dimères de XRCC4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub>, probablement dû à l'organisation du cristal (figure 33b). La maille du cristal étudié présente une symétrie P6<sub>5</sub>22 et un paramètre de maille important (856Å) sur la direction de l'axe 6<sub>5</sub>. D'autre part, XRCC4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub> peuvent s'auto-assembler pour former de longs filaments hélicoïdaux avec une symétrie 6<sub>5</sub>. Ce filament résulte de la succession d'un dimère de XRCC4<sub>157</sub> (bleu) et un dimère XLF<sub>224</sub> (vert) qui interagissent principalement par leurs domaines N-terminaux. Le pas du filament hélicoïdal est donc de 856 Å et correspond à 6 molécules de complexe XRCC4<sub>157</sub>-XLF<sub>224</sub> (figure 33c). Dans le filament hélicoïdal formé, les domaines Coiled-Coil de XRCC4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub> sont inclinés de 30° l'un par rapport à l'autre (lignes pointillées). Les queues hélicoïdales de deux XLF<sub>224</sub> consécutifs ou de deux XRCC4<sub>157</sub> consécutifs sont ainsi inclinés de 60° (figure 33d) (17).



Figure 33: Structure cristallographique du complexe XRCC4157 -XLF224

a)- Les formes tronquées de XRCC4 et XLF où la partie tronquée de chaque protéine est indiquée en gris. N-ter : N-terminal, C-ter :C-terminal, C-C : Coiled-Coil. b) L'unité asymétrique du cristal est constituée de deux complexes (A et B), chacun formé par un dimère de XRCC4<sub>157</sub> en bleu (bleu claire et bleu foncé) et un dimère de XLF<sub>224</sub> en vert (vert claire et vert foncé). Les dimères de XRCC4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub> interagissent via une interface principale "i1" et deux régions de contact "c2" et "c3. Chacune de ces interfaces et régions de contact sont trouvées deux fois (A et B). Les interfaces i1-A et i1-B (cercles noirs) sont médiées par les domaines « tête ». c)- Un arrangement en filament du complexe XRCC4<sub>157</sub> XLF<sub>224</sub> dans le cristal. Trois homodimères de XLF<sub>224</sub> interagissent avec la même interface i1 au niveau de la région N-ter de chaque dimère tout le long de l'axe c du cristal. d). La même représentation qu'en c avec une rotation de 90° autour de l'axe vertical et un zoom plus élevé. Les barres d'échelle représentent 2 nm (17).

Par souci de simplification, nous utiliserons X4 pour nommer la protéine XRCC4. L'assemblage en filament de X4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub> a été caractérisé en Microscopie Electronique en coloration négative. Différentes conditions ont été étudiées à partir d'une solution contenant soit X4<sub>157</sub> seul soit XLF<sub>224</sub> seul ou un mélange équimolaire X4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub>. Les protéines sont préparées à une concentration de 1.8  $\mu$ M dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 7,5 NaCl 150 mM. L'analyse des images obtenues montre que les protéines X4<sub>157</sub> seules protéines XLF<sub>224</sub> ne forment aucun oligomère (figure 34 b). Au contraire, des filaments se forment avec un mélange équimolaire de X4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub> (figure 34 b, c, d). Ainsi, pour la première fois, un assemblage en filament des protéines X4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub> est observé. Ce sont de longs filaments (>1  $\mu$ m) qui ne semblent pas très rigides (figure 34 c). Les mesures

transversales de niveau de gris réalisées à l'aide du logiciel iTEM (Olympus SIS) montrent qu'il y a deux types de filaments d'environ 5 et 10 nm d'épaisseur, respectivement. La majorité des filaments sont de 10 nm d'épaisseur. Ils sont constitués de deux filaments de 5 nm, ce qui est corroboré avec les deux pics observés sur le profil f1 de la figure 34. Ces filaments s'entrelacent (flèche blanche, figure 34d) et s'enroulent d'où la perte des deux pics dans la section f2.

Les images montrent clairement que ces filaments sont composés de deux filaments fins qui s'entrelacent de manière hélicoïdale (la flèche noire : filament fin, la flèche blanche : filament double) (figure 34c).



*Figure 34 : Images en MET (coloration négative) de XRCC4*<sub>157</sub> *et XLF*<sub>224</sub> al et a2)- XRCC4<sub>157</sub> seul forme des petits bâtonnets d'environ 50nm b)- XLF<sub>224</sub> seul, c, d, e)-Le complexe X4, XLF forme de manière reproductible des filaments d'une épaisseur homogène (environ 10 nm) et de longueurs allant de 0,5 µm à plusieurs µm (grossissement 28980 ×). Les filaments de 10 nm les plus courants (flèche blanche) sont constitués de deux filaments minces (flèches noires) enroulés en hélice (grossissement de 63 000 ×). f1, f2) Profils de niveaux de gris d'une section transversale d'un filament intégré sur une longueur de 50 nm (f1 et f2). Dans la section f1, deux pics ont été observés sur le graphique et montrent que deux filaments de 5 nm constituent le filament de 10 nm. La flèche blanche marque une croix entre deux filaments de 5 nm. Le profil de niveau de gris de f2 présente un signal unique suggérant que le filament tourne sur lui-même (grossissement de 63 000 ×). La barre représente 50 nm.

Trois autres laboratoires ont caractérisé la structure cristallographique du complexe XRCC4-XLF en utilisant d'autres formes tronquées des protéines X4 et XLF (figure 35) (17)(374).



Figure 35: l'assemblage en filament de XRCC4 tronqué et XLF tronqué

a)- La structure cristallographique du complexe X4<sub>157</sub>-XLF<sub>224</sub> (dimère X4<sub>157</sub> en bleu, dimère XLF<sub>224</sub> en vert ) (17) b)- La structure cristallographique du complexe X4<sub>157</sub>-XLF<sub>224</sub> obtenue par le laboratoire de Junop (dimère X4<sub>157</sub> en bleu foncé, dimère XLF<sub>224</sub> en orange foncé)(373) c)- La structure cristallographique du complexe X4<sub>140</sub>-XLF<sub>224</sub> obtenue par le laboratoire de Tainer. Représentation de deux filaments qui s'enroulent (dimère X4<sub>140</sub> en bleu, dimère XLF<sub>224</sub> en rose foncé, le filament parallèle en jaune et orange foncé) (374), d)- La structure cristallographique du complexe X4<sub>164</sub>-XLF<sub>233</sub> obtenue par le laboratoire de Blundell (dimère X4<sub>164</sub> en bleu, dimère XLF<sub>233</sub> en rose foncé)(432). Les dimensions en Å représentent le pas de l'hélice de chaque filament.

Dans tous les cas, ces formes tronquées de protéines sont dépourvues du domaine C-ter considéré comme non structuré et elles ne diffèrent que dans la longueur des domaines Coiled-Coil tronqués. A chaque fois, les structures obtenues suggèrent un assemblage des deux protéines en filament hélicoïdal. Il est constitué alternativement d'une succession de dimères de X4 tronqués et de dimères de XLF tronqués qui interagissent principalement par le domaine N-ter comme ce qui a été décrit dans nos deux laboratoires par Ropars *et al.* en 2011(17) (373)(374)(432). L'angle de rotation entre le domaine Coiled-Coil de X4 tronqué et de XLF tronqué diffère d'une structure à une autre, ce qui entraîne des différences dans la torsion du filament et dans la dimension des cavités cylindriques centrales et en conséquence des différences sont aussi observées dans la dimension du pas de l'hélice (19) (figure 36).

La superposition des différents modèles d'assemblage en filament de protéines X4 tronqués et XLF tronqués montre qu'ils forment des filaments hélicoïdaux qui ont une hélicité gauche. Le pas de ces hélices varie de 720 Å à 856 Å pour un nombre constant de monomères de 12 molécules dimèriques. Le diamètre du pore central varie de 0 et 120 Å. Ces différentes structures obtenues en utilisant différents mutants de X4 laisse supposer que c'est la présence d'un domaine Coiled-Coil plus au moins long qui pourrait modifier le pas de l'hélice.



*Figure 36: Superposition des modèles d'assemblage en filaments XRCC4 tronqué et XLF tronqué* En rose le modèle obtenu par le laboratoire de Blundell en utilisant XLF<sub>233</sub> et XRCC4<sub>164</sub>, en bleu claire le modèle obtenu par le laboratoire de Tainer en utilisant XLF<sub>224</sub> et X4<sub>157</sub>, en violet le modèle obtenu par le laboratoire de Junop en utilisant XLF<sub>224</sub> et XRCC4<sub>157</sub>, en vert le modèle obtenu par le laboratoire de JB. Charbonnier en utilisant XLF<sub>224</sub> et XRCC4<sub>157</sub>. Le cadre représente la superposition d'un dimère de XRCC4 tronqué et un dimère de XLF tronqué. Figure adaptée de Ochi,T et al., (19).

Ces données structurales permettent de nous interroger sur le rôle de ce type de filament dans la voie du NHEJ. Il est proposé qu'il puisse jouer un rôle structurant en maintenant les deux extrémités d'ADN proches en vue de leurs ligation par la Ligase IV.

Il semble essentiel de définir la structure du complexe avec les protéines entières et notamment de prendre en compte l'impact des domaines C-terminaux puisque ces derniers sont importants dans les interactions avec les autres acteurs de la voie NHEJ ainsi qu'avec l'ADN. Nous nous sommes donc engagés dans la caractérisation des formes entières des protéines X4 et XLF.

I-2- Les formes entières de XRCC4 et XLF

#### a- XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> existent sous forme d'oligomères en solution

Pour caractériser l'état monomérique ou oligomériques de XRCC4<sub>FL</sub> et  $XLF_{FL}$ , la migration en gel d'électrophorèse natif et la chromatographie ont été utilisée.

# al-Gel d'électrophorèse natif

3,4  $\mu$ g de X4<sub>FL</sub> et 2,8  $\mu$ g de XLF<sub>FL</sub> sont déposés sur un gel d'acrylamide natif Bis Tris gradient 4-16 %. Après migration en conditions non dénaturantes dans un tampon 50 mM Bis Tris, 50 mM Tricine pH 6.8 à 150V pendant 3h. Le gel est révélé avec du bleu de coomassie (figure 37 a). Pour X4 on observe 2 bandes qui correspondent à des masses proches de 242 kDa et 480 kDa ; et 2 autres bandes qui migrent à des masses entre 720 kDa et 1048 kDa. Pour XLF, on observe 2 bandes, la première bande correspond à une masse de 146 kDa et la deuxième bande migre entre 242 kDa et 480 kDa.

Les premières bandes de X4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> migrent à une masse moléculaire au moins 4 fois plus important que la masse moléculaire théorique d'un monomère de X4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> (monomère X4<sub>FL</sub> : 39,466 kDa, monomère XLF<sub>FL</sub> : 34,649 kDa). Nous pouvons supposer que les formes entières n'existent pas à l'état de monomère en solution mais plutôt sous forme de multimètres. Ainsi les différentes bandes observées correspondent aux différents états oligomériques des protéines en solution (dimère, trimère, tétramère ...). Nous pouvons remarquer qu'il existe des états oligomériques de taille supérieurs en solution pour la protéine X4 par rapport à XLF<sub>FL</sub>.

#### a2- Chromatographie combinée à l'électrophorèse en gel SDS-PAGE

Pour détecter des interactions entre les protéines X4 et XLF, des analyses combinant la chromatographie d'exclusion de taille analytique et la méthode d'identification par gel SDS PAGE sont mises en place au laboratoire de J.B. Charbonnier. La chromatographie permet d'évaluer la masse moléculaire apparente et de conclure sur une éventuelle oligomérisation (figure 37) et le gel SDS PAGE permet d'identifier les protéines (figure 37) (thèse Jeremy AMRAM, 2015).

La calibration de la colonne Superdex 200 (HR 10/300 GL, volume total 24ml, GE-Healthcare) est réalisée en utilisant différentes protéines incluant la ferritine (Fer, 440 kDa), l'aldolase (Ald, 158 kDa) et l'albumine (Alb, 67 kDa). Les protéines  $XLF_{FL}$  ou  $X4_{FL}$  puis le mélange  $XRCC4_{FL}$  et  $XLF_{FL}$  sont alors chargées sur la colonne.



Figure 37: XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> existent sous forme d'oligomères

a- Gel natif Bis-Tris HClHClgradient 4-16% et révélation avec du bleu de coomassie b- Chromatographie combinée au gel SDS-PAGE. A1-Chromatogramme obtenu après élution de 6 nmoles de  $XLF_{FL}$  seul, B1-Chromatogramme obtenu après élution de 15 nmoles  $X4_{FL}$  et 6 nmoles de  $XLF_{FL}$ , Gels SDS PAGE des fractions d'élution collectées pour  $XLF_{FL}$  seul (A2),  $X4_{FL}$  seul (B2) et pour le mélange X4-XLF (C2). Vo : volume mort, Fer (Ferritine), Ald (Aldolase), Alb (albumine), la ligne verte désigne la bande  $XLF_{FL}$ , la ligne rouge désigne le complexe  $X4_{FL}$ -XLF<sub>FL</sub>.

Sur le chromatogramme après injection de 6 nmoles de XLF, un seul pic est observé avec un volume d'élution (Ve) de 12,6ml. Le volume d'élution de XLF se situe entre celui observé pour l'albumine (67 kDa) (Ve de 13,5 ml) et celui observé pour l'aldolase (158 kDa) (Ve de 12,2 ml) (figure 37 b A1). Ce volume d'élution n'est pas compatible avec un monomère de XLF (34,649 kDa), ce qui est également cohérent avec la première bande observée dans le gel natif. Ce volume est compatible avec un dimère de XLF (75kDa) dans une forme étendue due à la présence d'une région C-ter prédite comme non structurée (75 aa). Les fractions d'élutions obtenues sont ensuite analysées par gel dénaturant SDS PAGE pour identifier les protéines existantes dans les fractions. On observe dans les fractions du pic principal (25-28) une bande qui migre à 37 kDa qui correspond bien à la masse moléculaire d'un monomère de XLF (figure 37 b A2).

Pour X4<sub>FL</sub>, un volume de 15 nmoles de la protéine est chargé sur la même colonne. Le chromatogramme d'élution montre un pic principal avec un Ve de 10,5 ml. Le volume d'élution observé pour le pic principal de XRCC4 se situe entre celui de l'aldolase (158 kDa) (Ve de 12,2ml) et celui de la ferritine (440 kDa) (Ve de 10,0ml) (figure 37 b B1). Ce

résultat est également cohérent avec la première bande obtenue en gel natif pour X4. Ce volume d'élution n'est pas compatible avec un monomère de X4 (39,466 kDa). Si on rapproche ce résultat à celui obtenue en gel natif, ce retard d'élution ne semble pas être imputé à la présence du domaine C-term prédit lui aussi comme non structuré (133 aa) mais plutôt suggère un état multimérique supérieur à un dimère. Les fractions d'élution obtenues (17 à 23) sont ensuite analysées par gel SDS PAGE. On observe dans les fractions du pic principal une bande qui migre vers 49kDa, masse moléculaire proche d'un monomère de X4 (figure 37 B 2).

Sur le chromatogramme obtenu en injectant un mélange de 15 nmoles de X4 et 3 nmoles de XLF (ratio 5:1), on observe un pic principal qui correspond à un volume d'élution de 9,5 ml, entre le volume d'élution de la ferritine (440 kDa) et le volume mort V<sub>0</sub>. Le pic principal dans le mélange est élué en amont du pic principal des protéines seules. Les fractions d'élution obtenues (17-24) sont ensuite analysées par gel SDS PAGE. On observe que la protéine XLF migre dans les fractions 19 à 21 correspondants à des volumes d'élution entre 9,5 et 11 ml. Ces volumes d'élution ne correspondent pas aux volumes de la protéine XLF seule (figure 37 b C2). Ces observations suggèrent que XLF<sub>FL</sub> interagit avec X4<sub>FL</sub> et forment un complexe dont la stœchiométrie est non déterminée.

L'affinité de l'interaction entre X4 et XLF a été quantifié par calorimétrie à l'aide d'un système " VP-ITC" (MicroCal," Malvern) dans les mêmes conditions stœchiométriques que la chromatographie. La constante de dissociation, Kd, estimée à partir de cette expérience est de 3,9  $\mu$ M, une valeur très proche de celle mesurée avec X4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub> qui était de 4,2  $\mu$ M. La présence des régions désordonnées en C-terminales de X4 (133aa) et de XLF (75aa) n'a pas d'influence sur l'interaction entre les deux protéines (thèse Jeremy AMRAM, 2015).

En conclusion nous montrons en collaboration avec J.B. Charbonnier, que les protéines XRCC4 et XLF entières sont présentes sous forme de multimères en solution et que les formes multimériques de X4 sont supérieures aux formes multimériques de XLF (dimériques et plus pour X4 et seulement dimériques pour XLF). Par ailleurs, nous montrons que comme pour les protéines tronquées (X4<sub>157</sub> et XLF<sub>224</sub>), la protéine X4<sub>FL</sub> interagit avec XLF<sub>FL</sub>

#### b. XRCC4<sub>FL</sub> seul en absence de XLF forme des filaments

## *b1- Mise en évidence d'un assemblage de XRCC4<sub>FL</sub> en filaments par MET*

Pour déterminer l'état oligomérique de  $X4_{FL}$  en solution, nous avons analysé en MET différentes concentrations d'une solution de  $X4_{FL}$ . Nous utilisons la méthode de coloration négative pour observer l'arrangement oligomérique de X4 à différentes concentrations.

Des solutions de X4<sub>FL</sub> seules à 1 $\mu$ M, 2  $\mu$ M ou 4  $\mu$ M sont préparées dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM. Un volume de 5  $\mu$ l de chaque échantillon est déposé sur une grille de microscopie et contrasté par la méthode de coloration négative.



*Figure 38: Assemblage en filament de XRCC4<sub>FL</sub>* 

a: Filaments de X4<sub>FL</sub> en coloration négative à un grossissement de 85000: a) 4  $\mu$ M, b) 2  $\mu$ M et c) 1  $\mu$ M. c1 représente un zoom d'une partie du filament observé en c.

Les images obtenues en coloration négative montrent que contrairement à la protéine tronquée X4<sub>157</sub>, les protéines X4<sub>FL</sub> seules en solution s'assemblent en filaments (figure 38).

Dans les différentes conditions de concentration, l'assemblage de X4 en filament est spontané. Il ne nécessite ni la présence de magnésium, ni d'ATP, ce qui était déjà observé pour les filaments X4-XLF obtenues avec les formes tronquées. Les filaments ont des formes très homogènes et une structure régulière. Ils apparaissent comme des polymères hélicoïdaux (figure 38 c). La figure 38 c1 montre qu'ils sont formés de 2 filaments entrelacés. L'épaisseur moyenne des filaments est de 16 nm indépendamment de la concentration et leurs longueurs varient d'une centaine de nm à plusieurs  $\mu$ m. Nous remarquons également que la protéine X4<sub>FL</sub> n'existent pas exclusivement sous forme de filaments mais on observe aussi des états oligomériques dans le fond de l'image indépendamment de la concentration de XRCC4 (figure 38). Cette observation est en accord avec les résultats précédents en gel natif qui montrent que X4<sub>FL</sub> existe sous différents états oligomériques.

La méthode de coloration positive nous permet d'explorer une plus large gamme de concentration (de 5nM à 4  $\mu$ M) de protéines et de caractériser la longueur des filaments (figure 39). Les solutions protéiques sont préparées dans le même tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM. Un volume de 5  $\mu$ l d'échantillon est déposé sur une grille et contrasté par la méthode de coloration positive puis analysé en MET en mode d'imagerie Fond Noir.



*Figure 39: XRCC4<sub>FL</sub> forme des reseaux de filaments* a : Images en MET de la protéine X4<sub>FL</sub>en coloration positive à : a) 4 $\mu$ M, c) 0.5  $\mu$ M, d) 0.25  $\mu$ M, e) 50 nM, f) 5 nM.

Aux concentrations élevées, la densité des filaments  $X4_{FL}$  est importante avec des filaments qui s'entremêlent. Les filaments longs ont la capacité à faire des boucles, ce qui suggère

une certaine flexibilité du filament pouvant résulter d'une courbure ou d'une torsion reliée à une variation de la périodicité. Cela a déjà été observé sur les filaments avec les formes tronquées X4-XLF du fait de la faible zone d'interaction entre les domaines N-terminaux des dimères de protéines. Étonnamment, on remarque que pour les concentrations les plus faibles, la longueur des filaments diminue (figure 39 e-f). L'ensemble de ces données montre que la protéine X4<sub>FL</sub> entière en solution s'auto-assemble en filaments hélicoïdaux réguliers.

#### b2- Domaines protéiques impliqués dans l'assemblage de XRCC4 en filaments

Précédemment nous avons montré que le mutant X4<sub>157</sub>, dépourvu du domaine C-ter et d'une partie du domaine Coiled-Coil ne forme pas de filament (figure 34) alors que nous montrons que la protéine entière est capable de s'auto-assembler en filament. Les domaines Coiled-Coil et C-ter sont importants et responsables de l'assemblage de la protéine entière en filament. Nous avons utilisé un autre mutant de X4, XRCC4<sub>203</sub> dépourvu seulement de la partie C-terminale pour étudier sa capacité à former des filaments.

Une solution contenant XRCC4<sub>203</sub> à 2  $\mu$ M est préparée dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM. Un volume de 5 $\mu$ l de la solution est déposé sur une grille et contrasté par la méthode de coloration négative et ensuite observé en fond clair (figure 40 a).



Figure 40: Différence de comportement dans l'assemblage des filaments en fonction de la présence du domaine C-Ter

a : images MET de la protéine XRCC4<sub>203</sub> en coloration négative à  $2\mu$ M, b) XRCC4<sub>FL</sub> à  $2\mu$ M, a1, b1) : Zoom au niveau des filaments obtenus avec XRCC4<sub>203</sub> et X4<sub>FL</sub> respectivement.
Les images obtenues en coloration négative montrent que XRCC4<sub>203</sub> à 2  $\mu$ M forme aussi des structures filamenteuses (figure 40 a). Cet assemblage en filament de la protéine XRCC4<sub>203</sub> se fait en absence d'ATP et en absence du magnésium comme pour X4<sub>FL</sub> (figure 40 b). Nous remarquons que ces filaments ne ressemblent pas aux filaments de la protéine X4<sub>FL</sub> (figure 40 a1, b2). Ils sont plus épais, irréguliers et ont tendance à plutôt former des faisceaux de filaments qui s'entremêlent. Les filaments individuels sont très rares (figure 40 a). Ces résultats montrent que le domaine Coiled-Coil participe aux interactions protéine-protéine et contribuent au mécanisme de polymérisation de X4 en filament, mais il ne semble pas suffire à générer des filaments homogènes. La présence du domaine C-ter semble renforcer ces interactions et apparaît comme nécessaire pour à un assemblage homogène de X4.

## c- XLF<sub>FL</sub> ne forme pas de filaments

## c1- Caractérisation de XLF<sub>FL</sub> en MET

Pour déterminer l'assemblage de XLF en solution, nous avons utilisé le même protocole d'étude en MET que pour X4. Les solutions protéiques sont préparées dans le tampon A. Un volume de 5 µl de chaque échantillon à différentes concentrations est déposé sur une grille, contrasté avec la méthode de coloration négative et ensuite observé en fond clair.



*Figure 41: XLF<sub>FL</sub> ne forme pas de filaments* a : Images TEM de la protéine XLF<sub>FL</sub> en coloration négative à a)  $4\mu$ M, b)  $2\mu$ M, c)  $1\mu$ M.

Nous montrons que  $XLF_{FL}$  seul comme  $XLF_{224}$  ne forment pas de filaments quelques soient les concentrations en protéine utilisées. On observe uniquement les protéines qui tapissent le fond de l'image (figure 41 a, b, c). Ces observations nous indiquent que la présence du domaine C-terminal de XLF ne permet pas la formation de filaments contrairement à ce que nous venons de montrer pour  $X4_{FL}$ .

## d- XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> forment des filaments

## d1- Caractérisation du complexe X4FL-XLFFL en MET

Nous avons montré précédemment que les protéines  $X4_{157}$  et  $XLF_{224}$  sont capables de s'assembler en filament et que  $X4_{FL}$  interagit avec  $XLF_{FL}$ . Nous avons caractérisé la capacité du complexe  $X4_{FL}$ - $XLF_{FL}$  à s'assembler en filaments. Nous avons analysé en MET des mélanges de  $X4_{FL}$  et  $XLF_{FL}$  préparés dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM. Un volume de 5 µl de la réaction est déposé sur des grilles, contrasté par la méthode de coloration négative ou la méthode de coloration positive ensuite ces grilles sont analysées en fond clair et en fond noir annulaire, respectivement (figure 42).



Figure 42: Le complexe X4<sub>FL</sub>-XLF<sub>FL</sub> s'assemble en filaments

a - c : Images TEM des complexes  $X4_{FL}$ - $XLF_{FL}$  en coloration négative d - f : Images TEM des complexes  $X4_{FL}$ - $XLF_{FL}$  en coloration positive : a et d)  $X4_{FL}$ - $XLF_{FL}$  rapport 1/1, b et e)  $X4_{FL}$ - $XLF_{FL}$ rapport 1/0,5 ; c et f)  $X4_{FL}$ - $XLF_{FL}$  rapport 0,5/1.

Les analyses montrent que dans toutes les conditions (rapport équimolaire ou non), nous observons la présence de filaments qui ont la même structure hélicoïdale (figure 42) et qui sont très semblables aux filaments  $X4_{FL}$ . Nous pouvons à ce stade supposer que  $XLF_{FL}$  s'intercale dans la structure du filament  $X4_{FL}$  comme nous l'avons montré pour les

filaments des formes tronquées. Cependant là où les protéines tronquées s'assemblent dans une structure régulière de stœchiométrie parfaite 1 :1, les filaments mixtes  $X4_{FL}$ -XLF<sub>FL</sub> ne semblent pas respecter cette règle puisque des filaments sont observés à différentes stœchiométries. Ces observations sont en accord avec la capacité de X4<sub>FL</sub> à s'assembler seul pour former des filaments. Nous étudierons dans le chapitre suivant la capacité de XLF à influencer l'assemblage du filament X4<sub>FL</sub>.

## d2- Marguage aux billes d'or de XLFFL en MET

Dans un premier temps nous avons étudié la présence de  $XLF_{FL}$  dans les filaments  $X4_{FL}$  en utilisant une méthode de marquage des protéines avec des billes d'or de 5 nm de diamètre fonctionnalisées avec de l'acide nitrilotriacétique lié au nickel (Ni-NTA). Ces billes se lient de manière très efficace au tag histidine des protéines recombinantes. A fin de vérifier la spécificité de ce marquage, différentes configurations de mélanges ont été testés et comparées.

Dans un premier temps, nous avons analysé le marquage des filaments formés avec  $XRCC4_{FL}$  seul ( $XRCC4_{FL}$  possède un tag His). Nous mélangeons un volume de 5 µl de  $X4_{FL}$  à 14 µM avec 5 µl de billes d'or Ni-NTA à 0,5 µM dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM. Nous avons choisi de travailler en excès de protéines (28 fois plus que de billes d'or) même si cela suppose que toutes les protéines ne seront pas marquées, les filaments formés par XRCC4 seront marqués aléatoirement.

Ensuite pour analyser le marquage des filaments obtenus dans le mélange XRCC4 et XLF, nous avons marqué XLF avec les billes d'or. Initialement, 5  $\mu$ l de XLF<sub>FL</sub> à 14  $\mu$ M est incubé avec 0,2  $\mu$ M de billes d'or dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM. Les échantillons sont ensuite purifiés par chromatographie gel filtration. Ensuite, 1  $\mu$ M de protéines XLF<sub>FL</sub> marquées avec les billes d'or sont incubés avec XRCC4<sub>FL</sub> à 1  $\mu$ M dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 150 mM. La présence de XLF au sein de filament est ainsi révélé (figure 43) par microscopie électronique en utilisant la méthode de coloration positive et analysé en MET en fond noir annulaire et en fond claire.



*Figure 43:*  $XLF_{FL}$  *s'intègre dans le filament X4*<sub>FL</sub> a - b : Images TEM des filaments X4b<sub>FL</sub> en présence de billes d'or en coloration positive en mode fond noir et fond clair respectivement ; c - d : Images TEM des complexes X4<sub>FL</sub>-XLFb<sub>FL</sub> en coloration positive en mode fond noir et fond clair respectivement. Barres d'échelle : a1 et b1 = 50 nm ; a2 et b2 = 25 nm et c et d = 100 nm.

Nous pouvons constater que les filaments X4 sont décorés d'un nombre important de billes d'or sur toute la longueur du filament (flèches grises figure 43 a-b). Cette méthode permet bien de détecter la présence de protéines marquées dans des filaments. Nous pouvons aussi affirmer que la présence des billes d'or liées au tag histidine de la protéine  $X4_{FL}$  n'altère pas la capacité des protéines  $X4_{FL}$  à s'auto-assembler en filaments.

Lorsque que nous analysons les filaments mixtes  $X4_{FL}$ -XLF<sub>FL</sub> où XLF est préalablement marqué avec les billes d'or, nous montrons que XLF<sub>FL</sub> s'intègre bien dans le filament X4<sub>FL</sub> pour former un filament mixte X4<sub>FL</sub>-XLF<sub>FL</sub> (figure 43 c-d). Ces conditions ne permettent pas de donner des informations quantitatives sur le ratio XLF-X4 au sein du filament mixte. Ce n'est qu'une approche qualitative.

# I- 3- Structure des filaments XRCC4 par Microscopie Électronique

## a- Structure des filaments XRCC4 en coloration négative

La méthologie IHRSR a été appliquée sur les images des filaments XRCC4 par E.H. Egelman dans l'université de Virginie pour obtenir une reconstruction 3D du filament. Des colorations négatives du filament XRCC4 ont été réalisées en acétate d'uranyle avec lui dans son laboratoire, dans les conditions que nous avons mises au point, à savoir une goutte de 5  $\mu$ L d'une solution à 1 $\mu$ M de XRCC4 dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM sur une grille de microscopie recouverte d'un fin film de carbone. Une série de photos (50) a été réalisée en condition low dose. Ce sont les conditions utilisées en cryomicroscopie pour éviter les dégâts d'irradiation de l'échantillon (moins de 1000 électrons par nm<sup>2</sup> par seconde) et conserver ainsi la structure et la résolution de l'échantillon. Puis nous avons sélectionné des sections de filaments et E. Egelman a appliqué la méthode IHRSR pour déterminer une première structure à base résolution. Le premier résultat que nous avons observé ensemble concerne la grande variabilité du pas de la double hélice.



Figure 44: Distribution du pas défini par la méthode IHRSR. B : Section transversale du filament étudié

Dans la figure 44 nous avons représenté la distribution du pas (A) de la double hélice et nous pouvons observer que le pas passe d'un pas long à 590 Å à un pas court à 493 Å en utilisant un angle azimutal de 0,03 degré de rotation par Å. En moyenne nous avons un pas qui correspond à 537 Å pour une rotation de la double hélice de 0,67 degré par Å. D'autre part, en utilisant seulement les données centrales de la distribution du pas, E. Egelman a pu générer une coupe transversale du filament (figure 44 B), suggérant que le filament est en fait un filament à 2 brins et même que chaque brin semble contenir aussi deux brins égaux. Ce résultat est très positif si on le rapproche du résultat que nous avons modélisé et publié

en 2011 avec nos collaborateurs du packing des filaments X4-XLF tronqués dans le cristal P6<sub>5</sub>22 (figure 45).



*Figure 45: Modélisation de 4 filaments en parallèle* X4 en couleurs claires et XLF en couleurs sombres dans le cristal P6<sub>5</sub>22. Bar = 2nm

Le spectre de puissance moyen est calculé à partir des diagrammes de diffraction de toutes les sections de filaments (figure 46). Son analyse ne nous permet pas de définir clairement une symétrie.



Spectre de puissance moyen

*Figure 46: Spectre de puissance moyen* Le spectre est obtenu à l'aide des 33000 boites chevauchantes des images de filaments X4 en coloration négative.

La résolution limitée obtenue de ce spectre de puissance est liée à l'utilisation des images en coloration négative. Elle entraine des ambiguïtés intrinsèques qui ne peuvent être résolues avec les images seules. Pour définir la symétrie il a donc été nécessaire d'utiliser des données provenant de techniques complémentaires telles que l'ombrage à l'aide de métaux en MET ou les images topographiques en AFM.

## b- Détermination de la chiralité par MET et par AFM

Pour pouvoir poursuivre l'analyse et déterminer la structure tridimentionnelle du filament nous avons déterminé la chiralité par deux méthodes.

## b1-Détermination de la chiralité en MET par ombrage métallique

Nous avons préparé des grilles de filaments XRCC4 que nous avons adsorbé sur la grille comme pour la technique de coloration positive puis nous avons ombré les grilles pour obtenir une image en relief des filaments en mode fond noir sur le microscope Zeiss 912. Nous pouvons clairement voir sur différentes zones des filaments, les répétitions ou le pas de l'hélice ainsi que la chiralité gauche du filament (figure 47).



Figure 47: Détermination de la chiralité du filament XRCC4 par ombrage rotatif
A -B Images de filaments XRCC4 en relief obtenus après ombrage rotatif au tantale/tungstène. A barre d'échelle = 200nm, B : barre d'échelle = 60nm. On visualise la chiralité gauche du filament. C : Profil de niveau de gris tracé en suivant le filament, les pics représentent les répétitions. Soit D la distance entre plusieurs pics, n= le nombre de pics dans la distance D et R la répétition ou le pas de l'hélice. D : schéma représentant la chiralité du filament X4.

En traçant des profils de niveaux de gris le long des filaments ombrés on peut définir une valeur de répétition moyenne de 24 nm.

## b2- Détermination de la chiralité par AFM

5  $\mu$ l de solution de XRCC4 à 1  $\mu$ M (tampon A) sont déposés pendant 1 mn sur un mica fraichement clivé et activé par une goutte de 5  $\mu$ l de spermidine à 100  $\mu$ M. La surface est

ensuite rincée avec une solution diluée d'acétate d'uranyle à 0,2% pour stabiliser les filaments pour l'imagerie par AFM dans l'air puis sécher avec du papier filtre sans cendre. L'imagerie AFM a été réalisée en mode contact intermittent sur un système multimode (Bruker) fonctionnant avec un contrôleur Nanoscope V (Bruker).

Nous pouvons de nouveau visualiser clairement les répétitions du filament (figure 48) et nous confirmons la chiralité gauche (figure 48 C) des filaments XRCC4. Nous avons utilisé le même protocole que sur les images obtenues en MET pour définir une taille de répétition moyenne que nous définissons à 23 nm.



*Figure 48: Image obtenues en AFM, mode contact intermittant* On visualise parfaitelement la périodicité de la structure hélicoidale des filaments et on définit facilement la chiralité gauche du filament. A et B : barre d'échelle = 200nm, C : barre d'échelle = 50 nm.

## c- Etablissement de la première reconstruction 3D du filament XRCC4

Puisque nous avons pu définir sans équivoque la chiralité gauche du filament X4, E. Egelman a pu imposer cette chiralité pour déterminer la première reconstruction 3D du filament XRCC4 (figure 49) qui est présenté avec un pas moyen de 53,7 nm, valeur cohérente avec celle que nous avons pu définir en utilisant l'ombrage et l'AFM. Effectivement en AFM ou en ombrage nous avons defini une répartition sans distinguer les deux filaments qui compose le filament X4, ainsi nous avons definit une valeur de « pitch » pour un filament hélicoidale a 2 composantes. E. Egelman a défini la valeur de répétition pour un filament soit il définit le « lead » qu'il faut diviser par deux pour obtenir le « pitch » (figure 49).



*Figure 49: XRCC4<sub>FL</sub> forme un filament hélicoidale* A : Reconstruction 3D à basse résolution de filament X4. B : Représentation schématique d'un filament constitué de deux filaments.

Ces données sont très encourageantes mais pour augmenter la résolution il nous faut déterminer des conditions d'analyse en cryomicroscopie.

## d- Structure des filaments XRCC4 par Cryo-TEM

Pour obtenir la structure à haute résolution du filament, nous avons engagé la caractérisation de ces filaments en CryoEM en collaboration avec Gérard Péhau Amaudet sur la plateforme de crymicroscopie de l'Institut Pasteur. Ils sont équipés d'un Microscope FEG 200 kV et d'une caméra à détection directe Falcon II. 1700 photos ont été accumulées à un grossissement de 29000 et à un défocus de -3 microns. L'analyse d'image consiste ensuite à procéder à un découpage des hélices en sections et à leurs superpositions pour obtenir un spectre de puissance moyen et à appliquer l'algorithme développé par Ed Egelman. Plusieurs séries d'images réalisées ont révélé l'existence d'ordres différents. De nouveau le spectre ne nous permet pas de déterminer une symétrie sans équivoque de ces filaments. Ce désordre apparait être une propriété intrinsèque de ces filaments. Même si on n'a pas obtenu une structure à haute résolution en CryoEM du filament XRCC4<sub>FL</sub> seul, cette étude a mis en évidence une hétérogénéité structurale dans ce filament.



*Figure 50: Images Cryo-TEM du filament XRCC4 et spectre de puissance a,b* : Images en Cryo-TEM des filaments XRCC4 Grossissement de 50K avec une résoltion de 1,99Å par pixel et un défocus moyen de defocus -3µm, c- Spectre de puissance obtenu sur 13786 segments chevauchants.

Tous les tests réalisés montrent une grande variabilité du filament et une impossibilité d'obtenir une reconstruction 3D. Nous avons exploré différentes méthodes de crosslink et une nouvelle méthodologie de dépôt et de crosslink avec de la glutaraldéhyde 0,02 % améliore légèrement l'analyse. Nous avons obtenu la possibilité d'utiliser un CryoTEM 300 kV Titan Kryos à très haute résolution. Le bénéfice apporté à l'utilisation de ce type de microscopes réside dans les techniques récentes d'acquisition automatique d'images permettant d'acquérir des centaines de milliers de particules. L'analyse d'images devrait alors permettre de mieux traiter la problématique de la variabilité due à la flexiblité du filament par un système de classification.

## I-4- Discussion

En combinant les données en gel natif et la chromatographie, on a montré que XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> existent sous forme d'oligomères en solution. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres laboratoires en utilisant d'autres approches. Pour XRCC4, il a été rapporté que cette protéine existe sous forme d'homodimères ou de tétramères liées par un pont disulfure en se basant sur l'analyse de XRCC4 en SDS PAGE en présence ou non d'un réducteur doux (2*-mercaptoéthanol (2-ME)*) (273). La présence de ce pont disulfure est aussi suggérée par Junop MS en analysant la structure cristallographique de XRCC4 tronqué. Cette dernière montre que cette protéine forme un dimère ; chaque monomère comporte un résidu cystéine (130<sup>eme</sup> acide aminé) qui est situé au niveau de l'interface de dimérisation (119 à 155 aa). Ces cystéines peuvent potentiellement former un pont disulfure qui peut relier les deux monomères (354). Compte tenu du potentiel réducteur de l'environnement intracellulaire, il est peu probable que de telles liaisons par le pont

disulfure existent in vivo. L'oligomérisation de XRCC4 en dimères ou tétramères est aussi caractérisée par d'autres laboratoires en utilisant d'autres approches incluant la sédimentation à l'équilibre et l'analyse en SDS-PAGE de XRCC4 après crosslink au BS<sup>3</sup> (bis (sulfosuccinimidyl) suberate) ou l'analyse en SAXS de la protéine après séparation sur chromatographie d'exclusion de taille (273)(356). Pour XLF<sub>FL</sub> les résultats montrent la formation d'un seul complexe qu'on a définit comme étant un dimère ; ces résultats sont accord avec les études précédentes de XLF<sub>FL</sub> (367). La capacité de ces protéines à former des oligomères en solution est une propriété intrinsèque conservée au cours de l'évolution. En effet, les homologues de XRCC4 et XLF chez les levures Lif1 et Nej1 respectivement existent aussi sous forme d'homo-dimères en solution (153). La nature des domaines impliqués dans la dimérisation des protéines XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> n'est pas clairement établie. En se basant sur la structure cristallographique des formes tronquées des protéines, l'analyse de ces structures suggère la présence d'un domaine de dimérisation au début du domaine Coiled-Coil de chaque monomère de XRCC4 ou XLF. Pour XRCC4, un domaine de tétramérisation potentiel est rapporté au niveau du même domaine Coiled-Coil, au niveau de la zone d'interaction avec la Ligase IV (354)(359). Une tétramérisation à travers le domaine N terminal globulaire est aussi suggéré en se basant sur les modèles d'assemblage de XRCC4<sub>FL</sub> proposé en analysant des données de SAXS (356).

Nos analyses en MET des protéines XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> montrent pour la première fois un assemblage en filament de XRCC4<sub>FL</sub> seul en absence de XLF contrairement à ce qui a été montré pour les formes tronquées de ces protéines. XLF<sub>FL</sub> seul ne forme pas de filament en solution. Ces observations sont en accord avec la capacité de XRCC4 à former des multimères supérieures à ceux observés pour XLF. L'assemblage de XRCC4 en filament se fait en absence d'un support contrairement à ce qui a été montré pour d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. En effet les recombinases RecA bactérienne et RAD51 eucaryotes polymérisent sur l'ADN pour former des filaments présynaptiques compétants pour la recherche d'homologies (433)(434). L'auto-assemblage de XRCC4 ne nécessite pas la présence de cation divalent (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), ni d'ATP, de manière comparable la lamine qui forme des filaments nucléaires à la périphérie du noyau (435) et contrairement à ce qui a été montré dans l'assemblage des autres filaments connus, qu'il s'agisse de microtubules, d'actine ou de recombinases que je viens d'évoquer çi dessus (436)(437)(438). La capacité de XRCC4 à former des filaments sans magnésium et sans ATP et en absence du support ADN fait de cet acteur de la réparation une singularité. Aucune concentration critique en protéine n'est définit. Dans nos conditions

expérimentales, des filaments sont observés même à 5 nM de protéine. Toutefois, une diminution de la taille et de la densité des filaments sur la grille sont observées en diminuant la concentration de la protéine. Ces résultats suggèrent que la concentration en protéine module l'assemblage des filaments XRCC4, et c'est ce que nous allons étudier dans le chapitre suivant. Les filaments XRCC4<sub>FL</sub> ont une structure homogène et régulière. Les domaines Coiled-Coil et C-ter de cette protéine sont importants pour son assemblage en filament. En effet, en absence de ces domaines (X4157), on observe en MET, la formation des petits oligomères d'une taille inférieur à 50 nm. En absence du domaine Cter, XRCC4<sub>203</sub> s'assemblent en filaments. Ces derniers sont plus épais que ceux obtenus en présence du domaine C-ter. Ils présentent une structure irrégulière et ont tendance à former plutôt des faisceaux de filaments qui s'entremêlent. Les filaments individuels sont très rares. Le domaine Coiled-Coil est décrit comme impliqué dans la polymérisation de plusieurs protéines dans la cellule incluant la laminine et les filaments intermédiaires (439)(440)(441)(442). Dans cette étude nous montrons que ce domaine est impliqué dans l'assemblage de XRCC4 en filaments dans une structure différente de la structure de XRCC4 entier. Autre que la formation de filaments individuels nous avons aussi observé des filaments qui interagissent les uns avec les autres montrant ainsi un degré d'organisation supérieur. Ces études montrent que le domaine Coiled-Coil et C-ter de XRCC4 sont impliqués dans son assemblage en filament.

L'analyse du complexe XRCC4-XLF en combinant la chromatographie d'exclusion de taille et l'analyse des complexes en SDS PAGE montre que XRCC4<sub>FL</sub> interagit avec XLF<sub>FL</sub>. La présence d'interaction entre XRCC4 et XLF a été aussi déterminée in *vitro* précédemment par d'autres laboratoires en utilisant d'autres approches. Les essais de mutagènese dirigée dans les cellules montrent que les interactions tête-tête entre XRCC4 et XLF sont importantes pour la réparation des CDBs par la voie NHEJ *in vivo* (376)(377).

L'analyse en MET d'un mélange de XRCC4 et XLF montre qu'ils forment un filament similaire aux filaments  $XRCC4_{FL}$ . La présence de XLF dans ce filament est montrée par un marquage aux billes d'or de XLF taggé His dans un mélange de XRCC4 et XLF. L'obtention de filaments avec des mélanges non équimolaire suggère que la stœchiométrie des protéines dans ces filaments n'est pas la même que celle observée avec les protéines tronquées. Le mécanisme qui permet à XLF d'interagir avec le filament n'est pas clairement établi. L'assemblage en filaments de XRCC4 est un processus dynamique, les protéines XRCC4 s'associent et se dissocient le long de filament. Sachant que XLF présente une similarité dans sa structure avec XRCC4, il se peut que XLF s'intercale dans

le filament lors de la dissociation de XRCC4 sans perturber la structure du filament d'où la similarité de structure en MET observer entre les filaments XRCC4<sub>FL</sub> seul et les filaments mixtes XRCC4-XLF. Autre que son interaction avec XLF, XRCC4 interagit avec un autre partenaire de complexe de ligation à savoir la Ligase IV cette interaction est essentielle pour la stabilité et la fonction de cette dernière (342). Il a été mis en évidence aussi que XRCC4 phosphorylé par la kinase CK2 (Casein Kinase 2) interagit avec le domaine FHA (forkhead associated) des enzymes de maturation APLF, PNKP et APTX. Ces observations suggèrent que XRCC4 joue un rôle en amont de l'étape de ligation (311). L'interaction de XRCC4 avec les partenaires du complexe de maturation est requise pour une réparation optimale des CDBs in vivo à l'exception de l'interaction entre XRCC4 et APTX (311)(350). XRCC4 est une protéine multifonctionnelle qui interagit avec différentes protéines que ce soit dans le complexe de ligation ou en amont avec les protéines de maturation des extrémités. Les filaments XRCC4 peuvent jouer le rôle d'une plateforme de recrutement des partenaires de la voie NHEJ. Ces interactions sont probablement nécessaires pour effectuer certaines fonctions au cours de la réparation par la voie NHEJ. En effet, il a été montré qu'au cours de la réparation par la RH, certaines protéines interagissent avec le filament RAD51 et que cette interaction est nécessaire pour la réparation des CDBs. Phénomène également décrit pour Rad54 qui en interagissant avec les nucléo-filaments hRAD51 catalyse l'échange de brin au cours de la recombinaison homologue grâce à son activité de migration de branche (90)(91)(92).

En collaboration avec E. Egelman nous avons obtenue une première reconstruction 3D du filament  $XRCC4_{FL}$ . Il est composé de 2 filaments enroulés l'un autour de l'autre de façon hélicoïdale avec un pas de 54 nm. La chiralité gauche du filament a pu être caractérisée en AFM et en EM par des méthodes d'ombrage. Nos études en cryo microscopie n'ont pas permis pour le moment d'obtenir une structure à haute résolution du filament XRCC4 cependant, l'analyse de plusieurs séries d'images ont révélés l'existence d'ordres différents et ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité structurale dans ce filament. Cette hétérogénéité dans la structure peut expliquer la capacité de la protéine à intreragir avec plusieurs partenaires.

# II- Propriétés des filaments XRCC4<sub>FL</sub>

Le processus d'assemblage des protéines en filaments consiste en une polymérisation d'oligomères dont la nature n'est pas clairement définie. La polymérisation consiste à former un homopolymère et est initiée par une première étape de nucléation où plusieurs protéines interagissent pour former un noyau, suivie d'une étape dite d'élongation où des protéines s'ajoutent au noyau déjà formé. L'addition de plusieurs protéines induit la formation du polymère (filament). Les états d'équilibre résultent de la polymérisation (association) et de la dépolymérisation (dissociation) (figure 51).



Figure 51: Shéma du processus de polymérisation et de dépolymérisation

Caractériser la dynamique d'assemblage des filaments revient à étudier l'équilibre entre les deux processus de polymérisation et de dépolymérisation dans différentes conditions. Dans notre étude, on s'intéresse à l'étape d'élongation, les paramètres quantifiables dans cette étude sont la taille et le nombre de filaments.

# II-1- Les paramètres physicochimiques modulant l'assemblage des filaments XRCC4

Afin de définir les facteurs qui modulent l'assemblage de XRCC4<sub>FL</sub> en filaments nous avons utilisé la MET pour caractériser la longueur des filaments et leur nombre dans différentes conditions. Les échantillons sont préparés dans le tampon A, 5  $\mu$ l de la réaction sont déposés sur les grilles, contrastés par la méthode de coloration positive et observés en fond noir. Les effets de plusieurs paramètres physico-chimiques sont testés (concentration, temps, température), ainsi que l'effet de la présence de XLF et d'ADN.

Les mesures ont été réalisées en analysant 200 carreaux répartis sur 4 grilles, à savoir 50 carreaux par grille en moyenne. Le nombre d'observation est donc à prendre en compte

puisque certaines conditions sont favorables ou défavorables à la formation des filaments. Ainsi nous avons mesuré la longueur de chaque filament et leur nombre.

Nous avons fait varier la concentration en XRCC4 (5 nM, 50 nM, et 250 nM), le temps d'incubation (10 et 30 mn) et la température d'incubation (4°C, 25°C et 37°C). Cette étude a été réalisée pour définir et comprendre les paramètres de formation et de déstabilisation des filaments et le rôle de certains partenaires comme ici l'ADN et XLF dans leur capacité à stabiliser ou à déstabiliser les filaments.

Les filaments sont mesurés dans des conditions de coloration positive et d'observation en fond noir, ce qui permet d'avoir la meilleure représentativité des états de polymérisation des filaments. De manière tout à fait comparable, les propriétés de stabilisation du filament RAD51, acteur de la recombinaison homologue, ont été étudiées avec la même approche en microscopie électronique (443)(444).

Nous allons commencer par considérer les variables taille et concentration pour chaque température.

a- Effet de la concentration à différentes températures à 10 min d'incubation

La première étude considère l'effet de la concentration en XRCC4 en fonction de la température.



*Figure 52: Distribution en pourcentage de la longueur des filaments XRCC4<sub>FL</sub> incubés 10 min à 4°C* XRCC4<sub>FL</sub> est incubé à 4°C pendant 10 min à des concentrations de 5 nM, 50 nM et 250 nM. La valeur n correspond au nombre de filaments observés

A 4°C, on oberve que le nombre de filaments augmente (au moins 2 fois plus) avec la concentration : 225, 596 et 419 filaments pour 5, 50 et 250 nM respectivement.

Pour 5 nM de XRCC4, 92% de la population de filaments ont des tailles comprises entre 50 nm et 2 µm. 50% ont des tailles comprises entre 50 et 500 nm, 24 % de 0,5 à 1 µm et 18% de 1 et 2 µm de longeur. Globalement les filaments sont de petites longueurs avec des tailles majoritaires comprises entre 50 et 500 nm. L'augmentation de la concentration à 50 nM entraine une augmentation du nombre de filaments (deux fois plus) et une augmentation de leurs tailles comme l'indique l'histogramme (figure 52). La distribution est légèrement bimodale avec 33% des filaments qui ont des tailles comprises entre 50 et 500 nm et 28% qui ont des tailles comprises entre 1 et 2 µm. Globalement la taille des filaments a augmenté puisque la distribution est décalée avec maintenant 52% des filaments qui ont une taille comprise entre 500 nm et 2 µm. Enfin on confirme l'augmentation de la taille des filaments puisque 39 % des filaments ont des tailles supérieures à 2 µm pour 250 nM de XRCC4 contre 8% pour 5 nM. L'analyse de correlation de Spearman, qui est une analyse statistique non paramétrique montre une corrélation positive significative (r=0,42; p<0,0001) entre la taille et la concentration à une température de 4°C. Nous notons que les tailles de ces filaments obtenues in vitro sont importantes et peuvent être comparées aux tailles observées dans le cas des microtubules issus de la polymérisation de la tubuline.







A 25°C le nombre de filaments augmente aussi avec l'augmentation de la concentration (299, 357 et 442 respectivement pour 5, 50 et 250 nM) mais de façon plus discrète. Nous ne détectons pas de population majoritaire de filaments en fonction de la concentration. La distribution de taille ne semble pas évoluer en fonction de la concentration comme à 4°C. Cependant nous observons que pour 5 nM de XRCC4, seulement 77% des filaments ont une taille inférieure ou égale à 2µm alors qu'à 4°C cette population s'élevait à 92%. Alors que ce groupe diminue drastiquement (55%) pour 250 nM de XRCC4 à 4°C, il reste relativement constant (69%) pour 250 nM de XRCC4 à 25°C. Globalement quelque soit la concentration de XRCC4, les filaments sont plus grands à 25°C qu'à 4°C, réussissant à atteindre une taille maximale supérieure à 5µm pour chaque concentration. L'analyse de Spearman montre une corrélation significative (p<0,005) avec un r=0,07 démontrant que pour cette gamme de concentration à 25°C la taille des filaments est indépendante de la concentration.







A 37°C, le nombre de filaments diminue très significativement, 136 filaments pour la concentration de 5 nM, 76 à 50 nM et seulement 12 à 250 nM. Les filaments sont

globalement de petites tailles. Pour 5 nM de XRCC4 comme pour 250 nM, 36% et 42 % de la population des filaments à une taille comprise entre 50 et 500 nm. Cependant nous notons que le pic de population majoritaire se déplace vers des filaments de taille comprise entre 1 et 3 µm (48%) pour 50 nM de XRCC4, et que pour 250 nM, la distribution est de nouveau bimodale avec 42% de la population de filament ayant une taille comprise entre 50 et 500 nm et 33% entre 1 et 2 µm. Dans l'ensemble, les tailles des filaments augmentent avec la concentration de XRCC4. Ainsi l'analyse de Spearman montre une corrélation positive significative (r=0,17; p<0,005) entre la taille des filaments et la concentration à 37°C. Etonnamment, nous notons que cette corrélation est plus erratique à 37°C qu'à 4°C. Effectivement les filaments sont plus petits à 250 nM ( $100\% < 3\mu m$ ) par rapport à ceux formés à 50 nM (seulement  $84\% < 3\mu$ m). Nous reviendrons sur cette observation à priori surprenante. Le faible nombre d'observations dans ces conditions rend difficile l'analyse à 37°C mais permet cependant d'émettre l'hypothèse que cette température favorise la dépolymérisation. Comme les filaments à 250 nM sont plus petits, une deuxième hypothèse est que le désordre en solution généré par la température est à l'origine d'oligomérisations désordonnées et donc partiellement abortives.

Nous allons à présent considérer les variables taille et température pour chaque concentration.

b- Effet de la température à différentes concentrations à 10 min d'incubation *b1- A 5 nM* 





5 nM de XRCC4 incubé pendant 10 min à des températures de 4°C, 25 °C et 37°C. La valeur n correspond au nombre de filaments observés.

A 5 nM, le nombre de filaments est équivalent à 4°C et à 25°C, soient 225 et 299 respectivement ; Il diminue pratiquement de moitié (136 à 37 °C). A 4°C, l'élongation des filaments est faible, seulement 8% des filaments ont une taille > à 2  $\mu$ m contre 24% à 25°C et 37°C. De plus à 4°C et 37°C, la majorité des filaments (50 et 36% respectivement) sont des filaments courts, dont les tailles sont comprises entre 50 et 500 nM, alors qu'à 25°C la majorité des filaments (28%) ont des tailles comprises entre 1 et 2  $\mu$ m. Ainsi les filaments sont deux fois plus grands à 25°C. 25°C semble être la température qui favorise l'élongation des filaments en terme de nombre et de longueur. L'analyse de Spearman, montre une corrélation positive significative (r=0,2 ; p<0,0001) entre la taille des filaments de taille > à 2  $\mu$ m à 25°C et 37°C par rapport à 4°C.

Ainsi à 5 nM de XRCC4 les filaments sont favorisés à 25°C.





Figure 56: Distribution en pourcentage de la longueur des filaments XRCC4 (XRCC4 à 50 nM incubé 10 mn)

XRCC4 à 50nM incubé pendant 10 mn à des températures de 4°C, 25°C et 37°C. La valeur n correspond au nombre de filaments observés.

A 50 nM, le nombre de filament est nettement plus important à 4°C et à 25 °C (596 et 357 respectivement) qu'à 37°C où il n'y a que très peu de filaments à savoir 76. Mais nous notons également que le monbre de filaments est plus important qu'à 5 nM. Ainsi comparativement à ce que l'on observe à 5 nM, à 50 nM l'élongation des filaments est plus importante. Ainsi 16 % des filaments ont une taille > à 2  $\mu$ m à 4°C pour atteindre 42 % à

 $37^{\circ}$ C soit dans tous les cas, on compte deux fois plus de filaments > à 2µm à 50 nM qu'à 5 nM. La distribution de la taille permet de faire ressortir que à 4°C globalement les filaments sont plus petits qu'à 37°C (33% de filaments < à 500 nm à 4°C contre 17% à 37°C). Comme pour la condition à 5 nM, l'analyse de Spearman montre une corrélation positive significative (r=0,16 ; p<0,0001) entre la taille des filaments et la température ce qui est concordant avec l'augmentation de la population de filaments > à 2µm. 25°C reste la condition où l'élongation est favorisée, même si 37°C semble être une condition favorable aussi à cette concentration.



*b3- A 250 nM* 

Figure 57: Distribution en pourcentage de la longueur des filaments XRCC4 (XRCC4 à 250 nM incubé 10 min)

XRCC4 à 250 nM incubé pendant 10 mn à des températures de 4°C, 25 °C et 37°C. La valeur n correspond au nombre de filaments observés.

A 250 nM, le nombre de filaments reste important à 4°C et à 25°C mais diminue drastiquement à 37°C. Immediatement nous constatons que la condition 37°C est de nouveau défavorable à l'élongation du filament, seulement 8% des filaments ont une taille > à 2  $\mu$ m alors que cette population de filaments représentait 32% et 45% pour 25°C et 4°C respectivement. Ainsi la population majoritaire (42%) à 37°C sont des filaments de petites tailles comprises entre 50 et 500 nm, c'est deux fois plus qu'à 25°C et 3,5 fois plus qu'à 4°C. Ainsi l'analyse de Spearman montre une corrélation négative (r= - 0,19) entre la longueur des filaments et la température. La distribution des filaments à 37°C est très

étonnante et ne semble pas respecter de règle, mais la perte drastique de nombre de filament est responsable de cette lecture ambigue.

Par contre, quelque soit la concentration utilisée, 25 °C semble être la meilleure condition pour obtenir un état d'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation/déstabilisation des filaments XRCC4.

Pour finir nous allons analyser les variables taille et concentration pour chaque température mais nous ajoutons le paramètre temps en nous plaçant à 30 min d'incubation.

c- Effet de la concentration à différentes températures à 30 min d'incubation



c1- A 4°C

*Figure 58: Distribution en pourcentage de la longeur des filaments XRCC4 incubés 30 min à 4°C* XRCC4 à différentes concentrations 5nM, 50nM et 250 nM est incubé 30 mn à 4°C. La valeur n correspond au nombre de filaments observés.

A 4°C, les filaments formés sont clairement favorisés par l'augmentation de la concentration. Ainsi à 5 nM, 60% des filaments ont des tailles comprises entre 50 et 500 nm et seulement 8% des filaments ont des tailles supérieures à 2  $\mu$ m. Situation inversée à 250 nM, où la population de filaments dont les tailles sont comprises entre 50 et 500 nm baisse à 14% et la population majoritaire devient la population de filaments de tailles supérieures à 2  $\mu$ m (44%). Le nombre de filaments est similaire dans chacune des conditions (390, 425, 310, pour 5, 50 et 250 nM respectivement). La distribution des populations à 5 nM, 50 nM et 250 nM sont bien marquées et on visualise clairemant le

déplacement de la population majoritaire vers les plus grandes tailles lorsque la concentration augmente (60% des filaments entre 50 et 500 nm à 5 nM, 55% des filaments entre 500 nm et 2  $\mu$ m à 50 nM et 44% des filaments supérieurs à 2  $\mu$ m à 250 nM). Ainsi, l'analyse de Spearman montre une corrélation positive significative (r=0,49 ; p<0,0001) entre la taille des filaments et la concentration de XRCC4. A 4 °C, plus la concentration augmente, plus la taille des filaments augmente.

Nous constatons qu'à 4°C nous avons exactement le même schéma quelque soit le temps d'incubation (10 ou 30 mn).



*c2-A* 25°*C* 

*Figure 59: Distribution en pourcentage de la longeur des filaments XRCC4 incubés 30 min à 25°C* XRCC4 à différentes concentration 5nM, 50nM et 250 nM est incubé 30 mn à 25°C. La valeur n correspond au nombre de filaments observés.

A 25°C, on observe le même phénomène qu'à 4°C. Certes le nombre de filaments est moins important mais il reste constant quelque soit la concentration comme à 4°C. De même on visualise parfaitement le déplacement de la population majoritaire. Ainsi à 5 nM, 81 % de la population de filaments a une taille comprise entre 50 et 500 nM. A 50 nM, la population majoritaire devient la population de filament dont la taille est comprise entre 500 nm et 2  $\mu$ m (48%). Et enfin à 250 nM, la population majoritaire est représentée par les filaments dont la taille est supérieure à 2  $\mu$ m (43%). Ainsi, l'analyse de Spearman montre une corrélation positive significative (r=0,6 ; p<0,0001) entre la taille des filaments et la concentration. A 25°C, alors que sur des temps courts (b1) les paramètres tailles des filaments et concentration de XRCC4 sont indépendants, ces paramètres deviennent dépendants avec le temps. Les tailles des filaments augmentent lorsque la concentration en XRCC4 augmente.

## *с3-А 37°С*

A 37°C, la rareté ou l'absence de filament ne nous permet pas de réaliser un histogramme. Il semblerait que la déstabilisation des filaments à des temps longs soit trop importante. Nous avions déjà constaté ce phénomène pour des temps courts (c1), où même si nous montrons une corrélation positive entre la taille des filaments et la concentration de XRCC4, globalement la taille des filaments est plus courte à 37°C qu'à 25°C et surtout le nombre de filaments à 37°C diminuent drastiquement. Globalement 37°C semble être une température qui favorise la déstabilisation des filaments.

En résumé, nous montrons une correlation positive significative entre la taille des filaments et la concentration de XRCC4 de manière indépendante de la température et du temps. Mais cette analyse fine nous permet d'apporter quelques nuances. Ainsi l'effet cumulatif du temps et de la température peut conduire soit à une déstabilisation importante des filaments pour 37°C pendant 30 min, soit à rendre les paramètres taille des filaments et concentration de XRCC4 indépendants l'un de l'autre pour 25°C pendant 10 min. Ce qui renforce l'importance d'une telle caractérisation pour pouvoir choisir les conditions de travail pour étudier par la suite l'effet de l'ADN ou de XLF sur l'élongation et la stabilisation du filament XRCC4.

De la même manière nous montrons une corrélation positive significative entre la taille des filaments et la température d'incubation jusqu'à 50 nM, au-delà (250 nM) la corrélation devient significativement négative. Ce qui nous permet de conclure définitivement que 37°C est une température à considèrer tout particulièrement puisque la déstabilisation des filaments semble favorisée.

## d- Analyses statistiques

Après avoir considéré les paramètres deux à deux nous avons réalisé une étude statistique globale qui cherche une corrélation entre la taille des filaments et les 3 variables concentration, température et temps avec l'ensemble des conditions.

Ainsi nous constatons que nous obtenons les mêmes résultats statistiques que l'on inclut ou non les conditions à 37°C. Nous confirmons que la faible quantité de filaments obtenus à 37°C ne permet pas d'apporter des informations pertinentes dans l'analyse.

		Α	В	C
-		taille	taille	taille
≣	Correlation	VS.	VS.	VS.
		concentration	température	temps
_				
		Y	Y	Y
1	Spearman r			
2	r	0.3698	0.04618	-0.1511
3	95% confidence interval	0.3435 to 0.3954	0.01615 to 0.07614	-0.1803 to -0.1216
1				
5	P value			
5	P (two-tailed)	< 0.0001	0.0019	< 0.0001
7	P value summary	****	**	****
8	Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate
Э	Significant? (alpha = 0.05)	Yes	Yes	Yes
0				
1	Number of XY Pairs	4507	4507	4507

a-Resultats comportant l'ensemble des conditions pour les trois variables

b- Résultats comportant les conditions à 4°C et 25°C pour les trois variables

		Α	B	С
Ħ	Correlation	taille vs. concentration	taille vs. température	taille vs. temps
		Y	Y	Y
1	Spearman r			
2	r	0.3909	0.03903	-0.1523
3	95% confidence interval	0.3644 to 0.4167	0.008207 to 0.06978	-0.1823 to -0.1220
4				
5	P value			
6	P (two-tailed)	< 0.0001	0.0106	< 0.0001
7	P value summary	****	*	****
8	Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate
9	Significant? (alpha = 0.05)	Yes	Yes	Yes
10				
11	Number of XY Pairs	4283	4283	4283

Tableau 2 et 3 de résultats des tests statistiques de Spearman pour les 3 variables

Nous obtenons avec cette analyse globale, la certitude d'une corrélation positive significative entre la taille des filaments et la concentration de XRCC4. Ainsi plus la concentration augmente et plus la s des filaments augmente.

Nous constatons également une corrélation significative négative entre la taille des filaments et le temps. Effectivement plus le temps augmente et plus la taille des filaments diminue surtout à faibles concentrations (5 nM et 50 nM), effets qui s'estompent à plus forte concentration (250 nM).

Ainsi nous montrons que la gamme de concentration testée ne permet pas de contrer l'effet temps et qu'à faible concentration le temps semble favoriser la depolymérisation. Cependant nous devons noter que ne pouvons pas prendre en compte dans cette étude la variable nombre de filaments. Le fait que le nombre de filament diminue drastiquement avec le temps est une variable importante qui peut nous permettre d'avancer une autre hypothèse pour expliquer la diminution de la taille des filaments. Nous l'aborderons dans le chapitre suivant.

Enfin, nous constatons également que les variables taille des filaments et température sont indépendantes de façon significative. Cette analyse n'est pas complétement surprenante, puisque nous avons déjà observé précédement que la corrélation entre la taille des filaments est significativement positive aux basses concentrations (5 et 50 nM) et significativement négatif à forte concentration (250 nM). Ainsi, la température favorise la polymérisation à de faible concentration de XRCC4 mais pour des concentrations plus élevée cette polymérisation semble moins favorable. Globalement les variables ne peuvent paraitre qu'indépendantes.

Ainsi si on essaie d'affiner l'analyse pour vérifier notre hypothèse de correlation dependante de la concentration, on réalise une analyse de corréation entre la taille des filaments et la température dans le groupe des 10 min pour toutes les concentrations aux températures 4°C et 25°C et une analyse seulement pour les basses concentrations (5 et 50 nM).

a- Pour toutes les concentrations		itrations :	b- Pour les basses co		centrations :
∄	Correlation	A taille vs. température	Ì	Correlation	A taille vs. température
		Y			Y
1	Spearman r		1	Spearman r	
2	r	0.05639	2	r	0.1650
3	95% confidence interval	0.01469 to 0.09790	3	95% confidence interval	0.1168 to 0.2124
4			4		
5	P value		5	P value	
6	P (two-tailed)	0.0064	6	P (two-tailed)	< 0.0001
7	P value summary	**	7		****
8	Exact or approximate P value?	Approximate	·	P value summary	A
9	Significant? (alpha = 0.05)	Yes	8	Exact or approximate P value?	Approximate
0			9	Significant? (alpha = 0.05)	Yes
1	Number of XY Pairs	2338	10		
2			11	Number of XY Pairs	1689

1 10 1 1

Tableau 4 et 5 des résultats des tests de spearman dans les groupes de 10 mn

Les variables taille et température sont indépendantes significativement (r = 0.056, P<0,0064) avec toutes les données, alors que si l'on considère que les faibles concentrations (5 et 50 nM), alors les variables sont corréler significativement de façon positive.

Ainsi la taille des filaments est favorisée aux basses concentrations par la température, mais lorsque la concentration en XRCC4 est importante, la taille des filaments devient indépendante de la température. Si pour renforcer cette hypothèse on ajoute a l'analyse les valeurs obtenues à basses concentrations à 37°C, les variables taille et température restent corrélées positivement de façon significative.



Tableau 6 des résultats du test de spearman incluant les données à 37°C aux basses concentrations

Nous venons de démontrer que les variables concentration, temps et température influent toutes les trois sur l'élongation des filaments. Ces 3 variables ne sont pas indépendantes l'une de l'autre ainsi la variable concentration est capable de contrer l'effet de la variable temps et influt sur la variable température d'une façon que nous n'arrivons pas encore à expliquer.

La polymérisation des filaments est progressive et mieux ordonnée à 4°C, mais reste assez lente. La polymérisation dépend en toute logique de la concentration et la basse température permet de maintenir la polymérisation à des temps longs, 30 mn. L'augmentation de la température à 25°C et donc de l'agitation thermique favorise aussi la polymérisation, mais voit aussi apparaître un équilibre se mettant en place avec des événements de dépolymérisation. Ces événements sont plus sensibles aux basses concentrations comme à 5 nM qu'à des concentrations supérieures, 50 et 250 nM. Ces équilibres semblent devenir critiques à 37°C car l'agitation thermique favoriserait plutôt la dépolymérisation ou une polymérisation désordonnée qui finit par être abortive. Mais nous n'arrivons pas clairement à montrer ce phénomène, peut-être par que pour toute cette analyse un autre paramètre doit être prise en compte et nous ne l'avons pas encore évoqué dans ce document sauf au travers du nombre de filaments, c'est la capacité des filaments à faire des bridges ou pontages, en particulier avec l'augmentation de la température. C'est donc le sujet du paragraphe suivant.

## II-2- Les filaments XRCC4<sub>FL</sub> forment des réseaux

Nous avons déjà évoqué que les filaments pouvaient s'enrouler les uns autour des autres et présenter des dérivations en forme de fourches à l'origine de structures en réseaux (figure 39). Nous avons également vu que dans le cas de XRCC4<sub>1-203</sub> sans domaine C-ter, des faisceaux de filaments pouvaient être corrélés à des structures plus désordonnées (figure 40).

Un deuxième type d'évènement de pontage ou « bridging » intervient mettant en jeu aussi des interactions protéine-protéine. Ces évènements de bridging entrainent le repliement de certains filaments ou la formation de boucles dans le cas d'interactions intramoléculaires et des associations de filaments lors d'interactions intermoléculaires. Cela peut amener à des événements de condensation/agrégation favorisés à la fois par l'augmentation de la concentration et de la température. Ces mécanismes de condensation/agrégation sont à l'origine de la disparition des filaments sur les grilles de microscopie.

Ainsi la diminution du nombre de filaments observés peut avoir deux causes : des événements de dépolymérisation et des évènements de condensation/agrégation. Ce sont des évènements opposés puisque les mécanismes de bridging ont tendance à stabiliser les filaments. Mais ces événements de bridging éliminent des filaments de notre analyse précédente car ils ne sont plus mesurables. Les différentes figures de bridges observées sont rapportées dans la figure 60 où on peut voir des repliements de filaments sur eux même, correspondant à des interactions intramoléculaires (a, b) et des associations entre filaments correspondant à des interactions intramoléculaires (c, d).



*Figure 60: Différentes figures de bridges des filaments XRCC4<sub>FL</sub>* a, b bridges observés avec des interactions intramoléculaires, c,d bridges observés avec des interactions intermoléculaires.



Figure 61: Distribution des bridges observée à 10 min en fonction de la concentration de XRCC4<sub>FL</sub>

Pour prendre en compte ces événements de bridging et les corréler à l'analyse statistique précédente, les bridges ont été quantifiés et la distribution est rapportée dans la figure 61.

A 4°C, les bridges augmentent avec la concentration de manière très significative (2 et 6 fois plus d'événements de bridging à 50 et 250 nM qu'à 5 nM respectivement).

A 25°C le nombre de bridges augmente en fonction de la concentration mais de façon beaucoup plus discrète, on pourrait même dire qu'il se stabilise. L'augmentation de concentration à cette température ne semble pas influencer la formation des bridges. Pourtant le nombre de bridges à 5 nM à 25°C est 3 fois plus important qu'à 5 nM à 4°C, mais il est presque 1,5 fois plus faible à 250 nM à 25°C qu'à 4°C.

Enfin à 37°C le nombre de bridge augmente significativement avec l'augmentation de concentration jusqu'à 50 nM, mais on a une disparition totale des bridges observés pour la condition 250 nM. Alors que clairement le nombre de bridges est 4 et 3 fois plus important à 37°C par rapport à 4°C. La diminution, voire la disparition de bridges à 250 nM à 37°C est directement reliée à l'augmentation de l'agrégation. Les agrégats formés augmentent de taille, puisqu'ils trappent de plus en plus de filaments et ne se déposent pas sur la grille de microscopie ou ne peuvent pas être visualisés.

Nous montrons que la formation des bridges est très dépendante de la concentration et dépendante de la température. Ces événements d'agrégation sont trop importants à 37°C (quelque soit la concentration 35 et 44%) et peuvent participer au moins autant que la dépolymérisation dans la disparition des filaments unique à 37°C. Nous avons donc bien fait d'émettre des réserves sur la condition 37°C dans l'analyse statistique.

L'élongation des filaments est dépendante de la concentration, du temps d'incubation et de la température. Nous montrons que la condition 37°C n'est clairement pas adaptée, car les événements de polymérisation et de bridging sont beaucoup trop favorisés. Nous montrons qu'à 4°C, la polymérisation est lente mais il faut une concentration importante de XRCC4 (250 nM) et un temps d'incubation long (30 mn) pour se placer dans une situation favorable à la polymérisation et alors la situation est aussi trop favorable à la formation de bridges. La condition 25°C est la plus adaptée puisque pour notre gamme de concentration et de temps, les filaments sont capablent de polymériser et dépolymériser sans pour autant être trapper dans des bridges (<30%).

Ainsi nous avons déterminé des conditions pour étudier l'effet de la présence de XLF ou de l'ADN sur l'élongation du filament XRCC4.

# II-3- Elongation des filaments XRCC4<sub>FL</sub> en présence de XLF

Nous avons montré que XLF pouvait s'incorporer dans le filament XRCC4 et ce de manière non stœchiométrique contrairement au filament initialement décrit des protéines tronquées XRCC4-XLF. Nous avons exploré l'impact de XLF sur la formation du filament, en considérant les conditions de polymérisation de XRCC4 à 5 nM à 25°C. Deux rapports stochiométriques XRCC4/XFL ont été choisis à savoir 1/1 et 1/10

La distribution obtenue nous montre que XLF favorise la polymérisation du filament XRCC4, quand ils sont en concentration équimolaire et de manière encore plus significative dans un excès de 10 fois plus de XLF. En effet les filaments de taille supérieure à 2  $\mu$ m sont 4 fois plus nombreux lorsque XLF est en excès.



*Figure 62: Effet de XLF sur la distribution en pourcentage de la longueur des filaments XRCC4* Un mélange de XRCC4 à 5 nM avec XLF à 0 nM, 5nM ou 50 nM incubé 10 min à 25°C

1	I I I	l.	
(		Α	
30	Constation	taille X4	
■	Lorrelation	VS.	
		conc XLF	
		Y	
1	Spearman r		
2	r	0.2675	
3	95% confidence interval	0.1940 to 0.3379	
4			
5	P value		
6	P (two-tailed)	< 0.0001	
7	P value summary	****	
8	Exact or approximate P value?	Approximate	
9	Significant? (alpha = 0.05)	Yes	
10			
11	Number of XY Pairs	679	
12			

Tableau 7 des resultats du test de spearman incluant les données à 25°C pour l'impact de XLF sur l'assemblage des filaments

L'analyse de Spearman montre une corrélation positive (r=0,26; p<0,0001) entre la longueur du filament et la concentration de XLF

# II-4- Elongation des filaments XRCC4<sub>FL</sub> en présence d'ADN

a-Polymérisation des filaments XRCC4 indépendante de la présence des extrémités libres d'ADN



Figure 63: Interactions des filaments XRCC4 avec l'ADN indépendamment de la présence d'extrémités libres

Nous avons étudié l'interaction de différents types d'ADNs linéaires et de tailles variables (50 pb, 600 pb et 1400 pb) ou d'ADN circulaire superenroulé négativement (pUC19) avec les filaments XRCC4. Les images obtenues avec tous les fragments d'ADN, sauf ceux de 50 pb montrent des filaments sur lesquels les ADN sont en interaction de manière tangentielle aux filaments. Le recrutement de l'ADN par les filaments est très spectaculaire. Il n'y a pas de polymérisation en un filament hélicoïdale autour de l'ADN contrairement à ce qui a été souvent proposé. Les fragments d'ADN sont ancrés en différents points assez distants et non de manière continue. Ces observations sont renouvelées avec des ADN circulaires (figure 63 et 65).

Les mêmes expériences ont été réalisées avec la protéine  $XRCC4_{203}$  et il y a très peu d'interactions avec l'ADN. Par ailleurs, les filaments tronqués  $XRCC4_{157}$ - $XLF_{224}$  n'interagissent pas avec l'ADN.

#### b- L'ADN favorise l'élongation: stabilisation des complexes

Nous avons étudié l'impact de l'ADN sur la polymérisation des filaments XRCC4 pour cela nous avons choisi une concentration de 5 nM pour XRCC4 et des fragments d'ADN de 600 et 1440 pb.



*Figure 64: Distribution en pourcentage de la longeur des filaments XRCC4* XRCC4 à 5 nM incubé pendant 10 min à 25°C en présence d'ADN, soit des fragments 600pb (0,8 nM molécules), soit des fragments de 1440pb (0,4 nM molécules).

Nous montrons très clairement que l'ADN favorise la polymérisation de XRCC4. La distribution des longueurs de filaments montre que la présence du fragment de 600 pb, même à faible concentration (0,8 nM de molécules) stimule la polymérisation de XRCC4 à 5 nM pour former des filaments de plus de 1 µm (60% en présence d'ADN de 600pb contre 48% en absence). Cette distribution est déplacée de manière encore plus significative (78% en présence d'ADN de 1440 pb). On constate que les filaments sont plus longs quand le fragment d'ADN est plus long, à savoir 1440 pb (39% de filaments de plus de 3 µm en présence d'ADN de 1440 pb contre 9% et 7% en présence d'ADN de 600 pb et sans ADN respectivement). Cela signifie que les contacts ou points d'ancrages avec l'ADN permettent la stabilisation des filaments probablement en diminuant les événements de dépolymérisation.

## c- L'ADN favorise la condensation des filaments

## *c1-L'ADN favorise la condensation des filaments XRCC4<sub>FL</sub>*

L'ADN qui est en interaction avec les filaments est à l'origine de bridges entre filaments. Ces bridges peuvent rassembler de très nombreux filaments pour faire des structures condensées. Sur la figure 65, on peut voir en MET l'ADN linéaire de 1440 pb (à 3 nM) s'accumuler sur les filaments. Cette figure illustre les évènements de bridging des filaments, médiés par l'ADN. Ainsi les filaments s'alignent les uns à coté des autres. Ces structures sont à l'origine d'événements de condensation typique. Nous pouvons observer différentes formes de condensats en notant que les plus fréquents sont des structures torriques contenant un mélange d'ADN et de XRCC4. Ces figures sont très typiques et contiennent un nombre de filaments très important, reliés entre eux par des fragments d'ADN.



*Figure 65: Condensation des filaments XRCC4<sub>FL</sub> en présence de l'ADN* XRCC4 à 200 nM est incubé 30 min à 25°C avec l'ADN linéaire 1440 pb à 3 nM molécules dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM. Les figures a-d représentent les differents degré de condensation des filaments observés. Barres d'échelle 500 nm

Les mêmes observations sont obtenues avec des ADN circulaires



*Figure 66: Condensation des filaments XRCC4<sub>FL</sub> en présence d'ADN circulaire* XRCC4 à 200 nM est incubé 30 min à 25°C avec 3nM molécules d'ADN superenroulé (pUC19) dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM. Les figures a-c représentent les differents degré de condensation des filaments observés. Barres d'echelle 200 nm.

Ce type de formes de tores sont similaires à celles observées avec de l'ADN en présence de cations trivalents ou tétravalents de type spermidine et spermine ou en présence de polylysine. Ces structures condensées sont reliées à des évènements de « molecular crowding » qui oriente des mécanismes de diffusion des acteurs protéiques sur l'ADN.

## c2-L'ADN favorise la condensation des filaments XRCC4<sub>FL</sub>-XLF

L'effet de la condensation des filaments par l'ADN est encore plus spectaculaire quand l'ADN (ici un fragment de 1440 pb) est associé à des filaments mixtes XRCC4-XLF étudiés précedemment. XRCC4 à 200 nM et XLF à 200 nM sont incubés à 25°C dans le tampon A en présence de l'ADN (1440 pb) à 3 nM molécules. Comme on peut le voir figure 67, les structures obtenues sont plus condensées quand les filaments sont constitués du mélange XRCC4-XLF.



*Figure 67: Condensation des filaments XRCC4-XLF en présence de l'ADN linéaire* Le mélange de XRCC4 à 200 nM et XLF à 200 nM est incubé 30 min à 25°C dans le tampon A en présence de l'ADN (1440pb) à 3nM molécules. Les figures a-c représentent les differents degré de condensation des filaments observés. Barres d'echelle 2 μm

## **II- 5-Discussion**

La Microscopie Electronique a permis de montrer que les filaments XRCC4 sont des structures dynamiques qui peuvent se former à de très faibles concentrations (à partir de 5 nM). La croissance de ces filaments se fait plus lentement à 4°C mais de manière plus ordonnée en raison de la plus faible agitation thermique, ce qui est favorable à la polymerisation et donc à la croissance des filaments. Quand on augmente l'agitation thermique (25°C) on atteind un état d'équibre entre polymérisation et dépolymérisation. A 37°C et des temps longs, les filaments dépolymérisent ou s'agrègent.

Nous avons montré que l'ADN stabilise et favorise la formation de ces filaments, probablement en limitant la dépolymérisation. Enfin XLF est aussi un acteur favorisant la formation des filaments de manière très significative.

Les filaments XRCC4 sont aussi capables de faire des bridges via des interactions protéine-protéine et de s'agréger pour former des structures difficiles à caractériser.

En présence d'ADN, les filaments XRCC4 ou XRCC4-XLF font des bridges médiés par l'ADN et des interactions protéine-protéine pour finir par former des figures de condensation très spécifiques. Ces figures de condensation similaires à celles obtenues avec de la polylysine ou de la spermidine correspondant à ce qui est appelé du « molecular crowding». Le « molecular crowding » est un phénomène physico-chimique qui se caractérise par l'attraction de macromolécules et qui génère des concentrations locales élevées modifiant aussi la viscosité des complexes macromoléculaires (445). L'encombrement macromoléculaire diminue l'espace de diffusion des macromolécules, et déplace ainsi les équilibres des interactions protéine-protéine et protéine-ADN et peut même modifier la conformation des protéines. Ainsi les cinétiques d'association qui sont contrôlées par les propriétés de diffusion de macromolécules sont modifiées dans ces phases condensées. Le « molecular crowding » est généralement décrit comme étant la conséquence d'un mécanisme d'exclusion de volume. Au sein d'une cellule, le « molecular crowding » est généré par certaines macromolécules, telles que des protéines, des acides nucléiques et des hydrates de carbone polymériques mais aussi par la spermidine présente à plusieurs mM dans le noyau eucaryote ou dans le nucléoide bactérien. Dans les études biochimiques, l'encombrement macromoléculaire peut être modulé par l'addition d'agents dits de « crowding » (généralement le polyéthylène glycol ou le ficoll, mais aussi la spermine ou la spermidine).

Les événements de bridging médiés par des interactions protéine-protéine sont aussi des acteurs de la condensation et peuvent être à l'origine du « molecular crowding » et ainsi permettre des mécanismes de diffusion facilitée au cours de mécanismes de recherche sur l'ADN et optimiser l'éfficacité des machineries moléculaires (445)(446). Les évènements de bridging ont été abondemment illustré pour les protéines telles que HNS, LrpC, Mre11 ou APE1 (447)(448)(449). Enfin, le « molecular crowding » a déjà été evoqué dans des mécanismes de réparation de l'ADN comme mécanisme favorisant la recherche des lésions par les glycosylases hOGG1 et hUNG (450)(451).
# III- Interaction de XRCC4, XLF et du complexe XRCC4/Ligase IV avec l'ADN

Les partenaires du complexe de ligation (XRCC4, XLF et Ligase IV) sont impliqués dans la dernière étape de réparation par la voie NHEJ. Dans ce complexe la Ligase IV grace à son activité de ligation restaure la liaison phosphodiester entre deux extrémités 3'OH et 5'P. XRCC4 et XLF ne présentent aucune activité enzymatique, ils sont considérés comme stimulant la ligation des extrémités soit en stimulant la ré-adénylation de la Ligase IV (452) soit en maintenant les extrémités libres d'ADN proches en vue de la ligation (361) (371)(373). La caractérisation de l'interaction de ces protéines avec l'ADN et l'analyse des complexes formés sont essentielles pour mieux comprendre la ou les fonctions de ces protéines au cours de la réparation par la voie NHEJ. Plusieurs, laboratoires ont étudié l'interaction de XRCC4, de XLF, du complexe XRCC4-XLF ou du complexe XRCC4/Ligase IV avec l'ADN. Ils ont montré que XRCC4<sub>FL</sub> seul, XLF<sub>FL</sub> seul ou le mélange XRCC4<sub>FL</sub>-XLF<sub>FL</sub> pouvaient interagir avec l'ADN. Cette interaction est indépendante de la séquence d'ADN mais elle est dépendante de sa taille (232)(233)(373). La taille minimale d'un fragment d'ADN nécessaire pour observer les complexes sur gel retard est 200 pb pour XRCC4 (232) et 83 pb pour XLF (233). L'interaction de XLF avec l'ADN implique des résidus du domaine C-ter (224-299aa) (373) alors que l'interaction de XRCC4 avec l'ADN implique des résidus du domaine C-ter et du domaine Coiled-Coil (157-336 aa). De manière similaire aux complexes ADN-XRCC4 ou ADN-XLF, les complexes ADN-XRCC4-Ligase IV sont difficiles à caractériser in vitro en utilisant des approches de gel retard (231).

Dans ce chapitre en combinant la technique de gel retard et la microscopie électronique à transmission nous caractérisons dans un premier temps l'interaction de XRCC4, de XLF et du complexe XRCC4-XLF avec l'ADN. Ensuite nous avons faire une étude péliminaire sur l'activité de la Ligase IV en présence de différents partenaires de la voie NHEJ.

# III- 1- Caractérisation en gel retard de l'interaction de XRCC4 et de XLF avec l'ADN

L'ADN double brin linéaire (1440pb) à 3 nM molécules est incubé dans le tampon A avec différentes concentrations de protéines. Après 30 min d'incubation à 25°C, les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose 0,3 % TBE 0.5X et soumis à un champ électrique de 90

V. Après 45 min de migration à température ambiante dans le tampon TBE 0.5X, le gel est coloré avec du syber gold, l'ADN est révélé sur une plaque UV (figure 68).



*Figure 68: XRCC4<sub>FL</sub>, XLF<sub>FL</sub> et le complexe équimolaire de XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> interagissent avec l'ADN* Gel d'agarose 0,3% TBE 0.5X, ADN 1440 pb à 3 nM molécules, XRCC4<sub>FL</sub> (0.5  $\mu$ M, 2  $\mu$ M et 4  $\mu$ M), XLF<sub>FL</sub> (0.5  $\mu$ M, 2  $\mu$ M et 4  $\mu$ M), le mélange équimolaire XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> (0.5  $\mu$ M XRCC4 et 0.5  $\mu$ M XLF, 2  $\mu$ M XRCC4 et 2  $\mu$ M XLF, 4  $\mu$ M XRCC4 et 4  $\mu$ M XLF). Le gel est coloré au syber gold et révélé sur plaque UV.

Pour XRCC4<sub>FL</sub> seul, un début de formation de complexes est observé en présence de 4  $\mu$ M de protéine. Il se traduit par un léger retard de migration de l'ADN par rapport au contrôle alors qu'aucun retard n'est observé à des concentrations inférieures (figure 68 pistes 3 à 5). La concentration en protéines nécessaire pour observer ces complexes est donc très élevée de l'ordre du  $\mu$ M. Ces observations confirment que les interactions de XRCC4 avec l'ADN sont a priori de faible affinité dans ces conditions comme cela a déjà été observé par gel retard. Les variations de concentration observées en fonction des auteurs (M. Modesti, S. Andres et G.Normanno) pour obtenir des complexes nous a interpellé sur la nature des complexes formés (232)(373)(453). En effet M. Modesti obtient en 1999 des complexes ADN-XRCC4 pour des concentrations de l'ordre de quelques centaines de nanomolaires (232). Les autres auteurs (Andres, S.N. et Normanno, D.) obtiennent des complexes avec des fragments d'ADN longs à des concentrations de l'ordre du micromolaire (2)(453). Ces constatations nous ammènent à une première hypothèse : les complexes ADN-protéines

seraient instables dans la matrice du gel, entraînant leur dissociation. Notre deuxième hypothèse découle directement de notre pécédent chapitre puisque nous venons de montrer que XRCC4<sub>FL</sub> peut exister sous forme de filaments. Les complexes ainsi observés en gel sont probablement obtenus avec les oligomères de XRCC4 libres et qui ne sont pas engagés dans des filaments. Plus on travaille à fortes concentrations de XRCC4, à 25°C, plus on favorise l'assemblage de XRCC4 en filament, et moins il y a de protéines libres en solution. Il faut augmenter donc la concentration en protéines pour observer des intéractions.

Pour XLF<sub>FL</sub>, des complexes sont observés en présence de 2  $\mu$ M de protéines, ils sont probablement de stœchiométries variables d'où la migration sous forme de « smear » (figure 68 piste 7). En augmentant la concentration de XLF<sub>FL</sub> à 4  $\mu$ M, on observe la formation de complexes qui migrent plus lentement que ceux obtenus avec 2  $\mu$ M de protéines (figure 68 pistes 7 et 8). Comme pour XRCC4<sub>FL</sub>, les complexes ADN-XLF sont observés sur gel à des concentrations élevées en protéines ce qui suggère là encore que les interactions de XLF avec l'ADN sont faibles ou instables.

Dans un mélange équimolaire de XRCC4 et XLF, des complexes sont observés en présence de 0.5  $\mu$ M de chaque protéine alors qu'aucun complexe n'est détecté à 0.5  $\mu$ M pour chacune des protéines seules (figure 68 pistes 3, 6, 9). Ces observations suggèrent que la présence des deux protéines renforce leurs interactions avec l'ADN. En augmentant la concentration des protéines on observe une augmentation dans la quantité de complexes formés et la diminution de la quantité d'ADN libre (figure 68 pistes 9, 10, 11). Pour une concentration donnée en protéines, les complexes obtenus dans le mélange équimolaire de XRCC4 et XLF migrent plus lentement que ceux obtenus avec XLF<sub>FL</sub> seul ou XRCC4<sub>FL</sub> seul. Précédemment, on a montré que XRCC4<sub>FL</sub> interagit avec XLF<sub>FL</sub> et forme un complexe XRCC4-XLF dont la stœchiométrie n'est pas déterminée. Les complexes formés dans ce mélange équimolaire sont probablement formés par l'interaction du complexe XRCC4-XLF avec l'ADN.

Ainsi nous avons montré que  $XRCC4_{FL}$  seul,  $XLF_{FL}$  seul et le mélange équimolaire XRCC4 et XLF interagissent avec l'ADN. L'interaction de ces protéines avec l'ADN apparaît instable. La présence simultanée de XRCC4 et XLF dans la solution renforce leurs interactions avec l'ADN.

## III- 2- Caractérisation des complexes en MET

Les propriétés de l'ADN et l'analyse des interactions ADN-protéine sont réalisées en MET grâce à la méthode développée au laboratoire qui utilise la coloration positive et l'imagerie fond noir (Voir matériels et méthodes). La technique d'étalement utilisé permet de conserver la conformation de l'ADN et d'analyser les interactions ADN-protéine dans un très grand champ de conditions expérimentales en terme de force ionique (454)(387). La microscopie électronique permet de visualiser les interactions, de cartographier les complexes ADN-protéine individuels, et éventuellement le changement de conformation induit par la liaison des protéines sur l'ADN. En utilisant cette approche j'ai caractérisé l'interaction des oligomères de XRCC4 et XLF avec l'ADN.

### a- Les complexes XRCC4-ADN

Nous avons précédemment discuté et montré que les filaments formés par XRCC4 pouvaient modifier la concentration de XRCC4 libre susceptible d'interagir avec l'ADN, même si nous avons aussi montré que les filaments pouvaient interagir avec l'ADN. Il s'avère que ce sont les mêmes domaines de la protéine qui à la fois sont impliqués dans la formation du filament et à la fois dans l'interaction avec l'ADN.

Il nous est donc apparu nécessaire de différencier les interactions XRCC4-ADN impliquant les oligomères libres et celles impliquant les protéines dans le filament. L'étude précédente des paramètres physico-chimiques modulant l'assemblage de XRCC4 en filament nous fourni les conditions expérimentales pour avoir majoritairement des oligomères de XRCC4<sub>FL</sub> libres en solution. XRCC4<sub>FL</sub> est préalablement incubé à 37°C, ces conditions sont défavorables à l'assemblage en filament ce qui permet d'obtenir plus de protéines libres qui peuvent potentiellement interagir avec l'ADN à l'état oligomérique.

L'ADN double brin linéaire de 1440 pb à 0,5 nM molécules est incubé avec 50 nM de  $XRCC4_{FL}$  dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 150 mM. Après 30 min d'incubation à 37°C, 5 µl d'échantillon sont déposés sur une grille avec la méthode de coloration positive puis observés en mode fond noir annulaire (figure 69).



*Figure 69: XRCC4<sub>FL</sub> bridge l'ADN* 

a : ADN 1440 pb seul à 0.5 nM molécules, b, c, d, e : ADN 1440 pb à 0.5 nM molécules incubé avec 50 nM de XRCC4 (bridges intramoléculairse). f, g, h : ADN 1440pb à 0.5 nM molécules incubé avec 50 nM de XRCC4 (bridges intermoléculaires), i : ADN 1440pb à 0.5 nM molécules incubé avec 200 nM de XRCC4 (bridge multimoléculaire)

En présence de XRCC4 à 50 nM, on observe la formation de différents complexes nucléoprotéiques (figure 69). Certaines molécules d'ADN sont partiellement ou totalement repliées sur elle-même issus d'interactions intramoléculaires (figure 69 b, c, d). D'autres complexes sont formés de deux molécules d'ADN liées issus d'interaction intermoléculaires. Les deux brins d'ADN sont liés soit en un seul ou plusieurs points le long de l'ADN. La taille de la zone de contact varie aussi d'une molécule à l'autre (figure 69 e, f, g). En augmentant la concentration de XRCC4 à 200 nM, on observe la formation de larges complexes avec plusieurs molécules d'ADN liées les unes aux autres (figure 69 i). Ces observations montrent que XRCC4<sub>FL</sub> est impliquée dans le repliement et le pontage

soit de deux zones distinctes d'un même ADN (pontage intramoléculaire), soit de différentes molécules d'ADN (pontage intermoléculaire). Le pontage de l'ADN s'étend sur quelques dizaines de nm de distance ; ces structures impliquent donc plusieurs protéines XRCC4 le long de l'ADN. Les ponts inter et intramoléculaires résultent de la polymérisation de la protéine le long de l'ADN via des interactions labiles et le pontage des brins adjacents par un mécanisme qui n'est pas encore déterminé mais qui stabilisent les complexes.

XRCC4 existe sous différents états oligomériques, ainsi des interactions protéine-protéine permettent de former des dimères, des tétramères de XRCC4. On suppose que les interactions protéine-protéine le long de l'ADN à travers les ponts ADN-proteine-protéine-ADN stabilisent ces complexes nucléoprotéiques dans des structures de bridges. Ainsi c'est la somme de plusieurs interactions faibles qui stabilisent ces complexes.

Pour déterminer si le pontage de l'ADN par XRCC4<sub>FL</sub> est dépendant de la présence d'extrêmités libres d'ADN, les mêmes conditions déterminées précédemment sont utilisées en remplaçant l'ADN linéaire par 0,29 nM molécules d'ADN superenroulées négativement (pUC19).



*Figure 70: XRCC4<sub>FL</sub> bridge l'ADN indépendamment de la présence d'extrémités libres d'ADN* a : ADN super enroulé négativement (pUC19), b, c, e, f : puc19 bridgé par XRCC4<sub>FL</sub>, d : schéma ADN superenroulé (haut) et superenroulé bridgé par XRCC4 (bas).

En absence de protéines, les molécules d'ADN superenroulées sont étalées sur le film de carbone dans leurs formes plectonémiques (figure 70 a). En présence de XRCC4<sub>FL</sub> à 50 nM, les brins d'ADN proches d'une même molécule sont liés (pontages intramoléculaires) (figure 70 b, c, e). En augmentant la concentration de XRCC4 à 200 nM, on observe davantage de structures complexes compactées (figure 70 f). Ces observations montrent que XRCC4 bridge les fragments d'ADN indépendamment de la

présence d'extrémités libres. Ces évènements peuvent être à l'origine d'un mécanisme de condensation des molécules d'ADN.

Le pontage ou bridging des molécules d'ADN par XRCC4 implique dans un premier temps la formation de complexes que je qualifie de complexes intermédiaires ou labiles (figure 71). Dans nos essais, nous n'avons pas pu observer ces complexes en TEM. Une des hypothèses est que les interactions entre XRCC4 et l'ADN sont de faible affinité avec des temps de résidence relativement courts ce qui ne permet pas de les observer en TEM sauf lorsqu'ils sont stabilisés dans des bridges et donc encore moins de les révéler par gel retard.

D'autres essais ont été mis en place dans le but de déterminer une polymérisation de XRCC4 sur l'ADN en testant différents paramètres incluant la concentration en XRCC4, la température d'incubation des complexes, la taille de l'ADN et la présence ou non d'ATP. Dans l'ensemble de ces essais on n'a jamais observé une polymérisation de XRCC4 sur l'ADN ni la formation de filament comme ce qui a été observé avec RAD51.



Augmentation de la stabilité

Figure 71: Shéma du mécanisme de pontage d'ADN par les protéines

### b- Les complexes XLF-ADN

L'ADN double brin linéaire 1440pb à 0.5 nM molécules est incubé avec 50 nM de  $XLF_{FL}$  dans le tampon A. Après 30 min d'incubation à 37°C, 5µl d'échantillon sont déposés sur une grille avec la méthode coloration positive puis observés en fond noir (figure 72).



#### *Figure 72 : XLF\_{FL} bridge l'ADN*

a : ADN linéaire 1440 pb 0.5 nM molécules, b : bridge intramoléculaire par XLF, 0.5 nM d'ADN 1440 pb incubé avec 50 nM de XLF, c : Bridge intermoléculaire par XLF, 0.5 nM d'ADN 1440 pb incubé avec 50 nM de XLF, d : bridge multimoléculaire, 0.5 nM d'ADN 1440 pb incubé avec 50 nM de XLF.

L'analyse des molécules d'ADN en présence de XLF à 50 nM montre la formation de structures de pontages comme pour XRCC4 (figure 72 b, c, d). XLF induit la formation de pontages intramoléculaires, la molécule d'ADN se plie sur elle-même (figure 72 b). En outre, XLF est aussi impliqué dans des évènements de pontage intermoléculaire (figure 72 c) entre deux molécules d'ADN différentes. Comme pour XRCC4, en présence de XLF on n'a pas pu observer la fixation de la protéine sur l'ADN suggérant que ces interactions sont aussi de faible affinité, cette hypothèse est en accord avec les essais en gel retard. XLF existe aussi sous forme de dimères en solution. Le domaine C-ter de XLF est impliqué dans son interaction avec l'ADN. Les complexes observés sont stabilisés par des interactions protéine-protéine le long de l'ADN et des interactions protéine-protéine qui permettent le pontage de l'ADN. En plus d'évènements de pontages intra ou intermoléculaires on observe aussi l'apparition de structures complexes. Ces dernières sont constituées de plusieurs molécules d'ADN liées les unes aux autres (figure 72 d). Comme pour XRCC4 on n'observe pas la polymérisation de cette protéine sur l'ADN ni la formation de structure en filament.

Pour conclure, nous avons montré que  $XRCC4_{FL}$  seul et  $XLF_{FL}$  seul sont impliqués dans le pontage des molécules d'ADN par un mécanisme qui implique des interactions protéineprotéine entre les molécules de XRCC4 ou de XLF. De plus, les deux protéines ne polymérisent pas sur l'ADN.

### c- Les complexes Ligase IV-ADN

La Ligase IV est instable et ne peut être obtenue au cours de la purification qu'en présence de XRCC4. C'est la raison pour laquelle nous considérons le complexe X4L4. Les préparations de X4L4 ne forment pas de filaments en solution (quelque soit la concentration). Cependant l'ajout de X4 à X4L4 permet d'obtenir des filaments dont on ne connaît rien de la composition. Nous n'avons pas pu réaliser de marquage avec les billes d'or pour visualiser la présence ou non de la Ligase IV dans ces filaments observés puisqu'elle n'a pas de tag His.

### c1-Liaison à l'ADN en absence d'ATP et magnésium

Dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, 2 nM molécules de plasmides pUC19 linéarisés avec l'enzyme XBaI (NEB) (ext4 nt-5' sortantes, 2686 pb) sont incubés avec

200 nM de X4L4 déphosphorylé (concentration en général utilisée dans les tests de ligation) pendant 30 minutes à 30°C. Juste avant l'étalement des complexes sur la grille de microscopie, les échantillons sont dilués 10 fois. Les grilles sont observées sur le microscope Zeiss 912 en mode fond noir filtré sur le pic sans perte d'énergie (Zero Loss). Les images sont obtenues avec une camera CCD Tengra (SIS Olympus) (figure 72).



*Figure 73 : Interaction de XRCC4-Ligase IV avec l'ADN* A : Image fond noir du plasmide pUC19 linéarisé par XbaI. B à E : Images fond noir des complexes pUC19 linéarisé-X4L4 (200nM). Barre d'échelle = 200nm

En présence d'ADN, nous n'observons pas de liaison préférentielle du complexe X4L4 aux extrémités de l'ADN (figure 73 B, C, D et E). Aucun assemblage en filament du complexe X4L4 n'est observé même en présence d'ADN. X4L4 s'oligomérise sur l'ADN mais ne forme pas de structure en filament de type helicoïdal même si les images pourraient suggérées la naissance d'un filament (figure 73 D). Le complexe X4L4 bridge les molécules d'ADN comme ce qui a été montré pour XRCC4<sub>FL</sub> et XLF<sub>FL</sub> seul. Cependant on ne peut pas affirmer que ces bridges dépendent que de la présence de Ligase IV.

### c2-Liaison à l'ADN en présence d'ATP et magnésium

La fixation du XRCC4-Ligase IV sur l'ADN est analysée dans des conditions similaires à celle utilisées dans les essais des ligations. Dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, Mg 5 mM, ATP 1mM, 3 nM molécules de plasmide pUC19 linéarisé par l'enzyme de restriction XbaI sont incubés avec différentes concentrations de X4L4 (50, 100, 200 et 400 nM) pendant 30 min à 30°C. Les échantillons sont dilués au 10<sup>eme</sup> avant le dépôt sur les grilles avec la méthode de coloration positive et l'observation en mode fond noir filtré

sur le microscope Zeiss LEO 912 AB. Les images sont réalisées en utilisant une caméra CCD Tengra (SIS Olympus) (figure 74).



Figure 74 : Images en microscopie fond noir filtré des complexe ADN-X4L4 en présence d'ATP et Magnésium

Incubation de 3 nM molécules d'ADN pUC19 linéarisé et de différentes concentrations de X4L4 en présence de 1 mM d'ATP et 5 mM de Mg. A : 50 nM de X4L4, B-C : 100 mM de X4L4, D-E : 200 mM, F-G : 400 mM. Barre d'échelle = 200 nm.

Nous pouvons clairement visualiser l'interaction de X4L4 avec l'ADN et la formation de bridges. Aucun assemblage en filament de complexe n'est observé en présence d'ATP et Mg<sup>2+</sup>. On notera que nous ne pouvons plus distinguer les extrémités libres du plasmide et

ce à partir de 200 nM de X4L4 (figure 74 D-G), les plasmides semblent pour certains être circularisés.

Pour confirmer cette hypothèse de re-circularisation nous avons analysé sur gel les produits de ligation après déprotéinisation. Pour cela nous avons ajouté au reste du volume réactionnel 2  $\mu$ l d'une solution contenant 0,2% de SDS, 0,3 mg/ml de protéinase K, 3 mM d'EDTA et 2 $\mu$ l de Bleu de charge, puis incubé 30 minutes à 50°C. Ce mélange est ensuite centrifugé 2 minutes à 14000g. 7 $\mu$ l de surnageant est déposé dans un gel d'agarose D5 0,6%. Les échantillons migrent en TBE 0,5X pendant 30 min à 90 V, 50 mA (figure 74).



*Figure 75 : Gel d'agarose des produits de ligation* Différentes concentrations de X4L4 testées en présence d'ATP et de magnésium.

Nous pouvons clairement visualiser sur le gel d'agarose de la figure 74 des produits de ligation à partir de 50 nM de X4L4. On observe à partir de 200 nM de X4L4 la recircuarisation du pUC19 que l'on proposait dans les images de microscopie. Les complexes X4L4 sont bien actifs.

# **III- 3- Discussion**

Nous avons démontré que les filaments XRCC4 ou XRCC4-XLF sont capables de recruter des molécules d'ADN qu'elles aient ou non des extrémites libres. Ces filaments sont même stabilisés par la présence de l'ADN. Par analogie au nucléofilament de type RAD51 impliqué dans la recombinaison homolgue qui polymérise sur l'ADN simple brin et même sur l'ADN double brin, il a été proposé que XRCC4 polymérise sur l'ADN à partir des extrémités. Plus encore, la démonstration du filament XRCC4-XLF tronqués d'une part et la mise en évidence d'autre part d'une intreaction de XRCC4 avec l'ADN, même à haute

concentration a amené certains auteurs à considérer que XRCC4 polymérise sur l'ADN, sans aucune démonstration directe (455)(456). Nous avons donc entrepris la caractérisation de l'interaction ADN-XRCC4. Pour cela, les gels retard sont habituellement utilisés. Pour XRCC4 les retards en gel observés ne se font qu'avec des fragments longs d'ADN au moins supérieur à 200 pb et qu'à hautes concentrations en protéines. Cela supposerait un Kd relativement élevé. Pour mémoire, une protéine ayant une forte interaction avec l'ADN a un Kd faible proche du nM. Cette difficulté à caractériser les interactions en gel suggère un comportement particulier de la protéine avec une instabilité importante. Nos résultats présentés ici montrent que nous sommes confrontés à deux mécanismes qui doivent êtres pris en compte dans l'interaction :

- d'une part la formation des filaments diminuant la concentration apparente de XRCC4 en solution. Les complexes formés avec ces filaments sont de toute façon exclus du gel.
- D'autre part il apparaît que la protéine sous forme oligomérique est instable sur l'ADN.

En 1999, M. Modesti a caractérisé pour la première fois l'interaction de XRCC4 avec l'ADN en gel retard. Dans cette étude 3 fmole d'ADN de longueurs variées (100, 200, 300 et 500 pb) marqué au  $P^{32}$  sont incubés pendant 30 min à 37°C avec des concentrations de XRCC4<sub>FL</sub> (de 8 nM à 1,4  $\mu$ M ) (232). Cette publication a pu montrer que l'interaction de XRCC4 avec l'ADN dépend de la longueur de l'ADN et de concentrations importantes de XRCC4. Les premiers retards sont obtenus à des concentrations de 1,4  $\mu$ M pour des fragments de 200 pb, de 520 nM pour des fragments de 300 pb et surtout de 120 nM pour des fragments de 500 pb. Par ailleur il faut noter que ces études sont faites à 37°C d'une part et en présence de Triton induisant la déstabilisation des filaments et l'augmentation de la concentration de XRCC4 libre.

Dans les études suivantes réalisées dans les laboratoires de M. Modesti et M. Junop, les complexes ADN-XRCC4 sont observés à température ambiante avec des fragments d'ADN plus longs et des concentrations de protéines beaucoup plus importantes (453).

La microscopie éléctronique telle qu'elle est utilisée au laboratoire (coloration positive et imagerie fond noir) permet de caractériser différents types de complexes nucléoprotéiques qu'ils soient stables ou instables. Elle permet d'analyser le comportement des protéines dans leurs mécanismes d'assemblage et de montrer les figures amenant à une stabilisation lorsque c'est le cas. Le laboratoire a caracterisé de nombreuses protéines qui courbent l'ADN et ainsi stabilise les complexes ADN-protéines (LrpC, MC1, nucléosome, HU, H-

NS), ou qui polymérisent le long de l'ADN comme un mécanisme de diffusion, de recherche (Fur, LrpC, H-NS, HU) (454)(457)(458)(459). La sensibilité de la microscopie électronique nous permet de montrer la formation de complexe XRCC4-ADN à de très faibles concentrations, à partir de 5nM contrairement à ce qui est observé en gel. Nous confirmons aussi la dépendance à la longeur d'ADN et la formation de complexes qui suggèrent une propriété particulière de XRCC4 sur l'ADN : la capacité à former ce qui est appellé maintenant couramment des bridges entre deux segments d'ADN distants lorsqu'il s'agit d'un rempliement de l'ADN (réaction intramoléculaire) ou de segments indépendants appartenant à deux molécules distinctes d'ADN (réaction intermoléculaire). Ce sont ces structures que nous avons pu mettre en évidence en microscopie et qui sont plus stables comme cela a déjà été montrées pour H-NS, LrpC, Alba ou pour APE1 (385)(449)(454)(460). Ces structures de bridge résultent de la polymérisation de la protéine le long de l'ADN via des interactions labiles et le pontage des brins adjacents par un mécanisme qui n'est pas encore déterminé mais qui stabilise les complexes. Cette polymérisation est totalement différente de celle de RAD51 qui forme un nucléopfilament hélicoïdal stable le long de l'ADN. La polymérisation qui est évoquée pour XRCC4 et difficile à caractériser. Elle résulte d'une oligomérisation le long de l'ADN qui reste très instable et qui en aucun cas forme des structures hélicoidales autour de l'ADN. Il ne s'agit donc pas de la même polymérisation le long de l'ADN. Ce n'est pas une polymérisation avec la formation d'un filament hélicoïdal ayant pour support l'ADN comme cela a été sugéré par certains auteurs.

Ce type de polymérisation est un processus dynamique mettant en jeux des interactions faibles ainsi qu'une dynamique importante le long de l'ADN. Ces mécanismes dynamiques peuvent être stabilisés par des mécanismes de pontage avec une séquence d'ADN éloignée du même fragment ou avec un fragment d'ADN différent. C'est ce qui a été proposé et montré dans le cas des protéines H-NS et LrpC (387)(461). Le temps de résidence sur l'ADN de ces protéines est très court et il est stabilisé par des interactions protéine-protéine le long de l'ADN (polymérisation) et par des interactions protéine-protéine dans le pontage ou bridging en anglais. Sachant que XRCC4 et XLF existent sous forme d'oligomères, il se peut qu'ils utilisent le même mécanisme pour induire les bridges. Ces pontages stabilisent localement les protéines tout en leurs permettant toute la dynamique nécessaire pour maintenir les complexes labiles et en maintenant les ADNs proches en vue de la ligation.

Comme pour XRCC4<sub>FL</sub>, les complexes ADN-XLF sont observés sur gel à des concentrations élevées en protéines ce qui suggère une faible affinité de XLF pour l'ADN. Nos résultats sont assez similaires à ceux obtenus par le laboratoire de M. Modesti (373).

Cependant, une étude antérieure (laboratoire de Lieber M. R.) montre des retards en gel des complexes ADN-XLF à des concentrations de XLF relativement faibles (de 50 nM à 100 nM) avec des ratios minimums de 1 protéine XLF pour 10 pb. Cette étude est réalisée en gel de polyacrylamide contrairement à notre éxpérience en gel d'agarose. Nous n'avons pas étudié les complexes dans les mêmes conditions que celles utilisées par Lu *et al.* (233). Nos résultats en TEM confirment la formation de complexe XLF-ADN à des concentrations inférieures à 100 nM. Nous montrons comme dans le cas de XRCC4, la formation de bridges intra et inter-moléculaires. Ces interactions peuvent être à l'origine de réseaux pouvant amener à de la condensation.

Concernant les complexes XRCC4-XLF avec l'ADN nous montrons que ces complexes se forment à des concentrations plus faibles que XRCC4 seuls ou XLF seuls en les analysant en gel retard. La MET nous permet de montrer des évènements de bridges inter et intramolécules plus imposants que ceux obtenus avec les protéines.

Nous avons montré en utilisant la technique de MET que le complexe XRCC4-Ligase IV interagit avec l'ADN. Dans ces essais nous avons utilisé un fragment d'ADN avec des extrémités 4 nt-5'sortantes. L'analyse des images montre que le complexe XRCC4-Ligase IV ne se fixe pas spécifiquement aux extrémités de l'ADN comme ce qui a été suggèré par Ling Chen qui utilise l'AFM pour analyser des complexes ADN-XRCC4-Ligase IV constitués de fragments de 400 pb ayant des extrémités 4 nt-5' sortantes (462). Dans nos essais nous montrons que le complexe XRCC4-Ligase IV interagit avec l'ADN en absence ou en présence de Mg<sup>2+</sup> et d'ATP. De plus dans les deux conditions le complexe se fixe le long de l'ADN et peut recouvrir la totalité de l'ADN. L'observation de ce type de structure résulte d'une oligomérisation sur l'ADN des protéines et peut être considéré à tort comme un nucléofilament. Dans une étude en microscopie à fluorescence super résolution associé avec un marquage adapté à la détection des CDBs, les structures observées proches des CDBs dans la cellule ont été assimilées à des filaments (455).

# IV- Interaction du complexe de ligation avec le complexe de reconnaissance

Il est admis que l'héterodimère Ku70/Ku80 est impliqué dans la reconnaissance des CDBs et qu'il est le facteur qui initie la réparation par la voie NHEJ. Le mécanisme de recrutement des autres partenaires lui n'est pas clairement établi. Dans les cellules l'analyse en microscopie à fluorescence de l'accumulation au niveau des CDBs de XLF et XRCC4/Ligase IV montre qu'elle dépend de la présence de Ku70/Ku80 aux cassures (203)(228). Ces observations suggèrent que Ku est un acteur important et qu'il participe à leurs recrutements au niveau des CDBs. La caractérisation de la nature des interactions protéine-protéine impliquées dans le recrutement de XLF et de X4L4 au niveau des CDBs est au centre de nombreuses études et discussions. Dans ce chapitre nous caractérisons dans un premier temps l'assemblage de Ku sur l'ADN, ensuite nous analysons l'interaction du complexe ADN-Ku avec XRCC4 et XLF. L'originalité de notre travail réside dans la caractérisation de l'interaction des filaments XRCC4 seul ou des filaments mixtes XRCC4-XLF avec le complexe ADN-Ku.

# IV-1- Assemblage de Ku70/Ku80 sur l'ADN

Deux approches sont utilisées pour caractériser l'interaction de Ku avec l'ADN à savoir la technique de gel retard et la microscopie moléculaire (MET et AFM).

a- Caractérisation de l'interaction de Ku avec l'ADN par gel retard

L'ADN double brin linéaire marqué au Cy5 est incubé dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8, NaCl 50 mM avec différentes concentrations de Ku70/Ku80.

J'ai caractérisé par gel d'electrophorèse le chargement du Ku sur des fragments de 70 pb marqué avec une cyanine 5, à différentes concentrations (7.5, 15, 30, 45, 75, et 90 nM), en utilisant deux temps d'incubation 15 mn et 30 min et, 3 températures, 4°C, 25°C et 37°C. Les incubations sont réalisées en parallèle pour chaque température et les gels d'une température sont mis à migrer en même temps dans la même cuve de migration.

Dans l'ensemble des gels, on peut remarquer qu'il y a au maximum 3 bandes, correspondants au chargement de 3 hétérodimères sur un fragment de 70 pb, et permettant

de déduire la taille couverte par Ku soit 20-23pb, donnée consistante avec la littérature (207)(208).

Après 15 ou 30 min d'incubation à 4°C, 25°C ou 37°C, les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose 2 % TBE 0.5X et soumis à un champ électrique de 90V, 56 mA. L'ADN marqué est révélé à l'aide d'un système imageur de gel, Typhoon 7000 fla (GE Healthcare).



*Figure 76 : Fixation de l'héterodimère Ku70/Ku80 sur l'ADN (70pb) à 4°C* Gel retard : gel d'agarose 2% TBE 0.5X, ADN 70 pb marqué Cy5 à 7,5 nM molécules, Ku70/Ku80 (0nM, 7,5 nM, 15 nM, 30 nM, 45 nM, 60 nM, 75 nM et 90 nM). a : incubation des complexes 15 min à 4°C, b : incubation des complexes

nM, 30 nM, 45 nM, 60 nM, 75 nM et 90 nM). a : incubation des complexes 15 min à 4°C, b : incubation des complexes 30 min à 4°C. L'ADN marqué est révélé à l'aide d'un typhoon gel imaging system (GE Healthcare).

Après une incubation de 15 min à 4°C, deux complexes sont formés à 7,5 nM de Ku correspondants donc au chargement d'un et de deux hétérodimères de Ku. A 15 nM, les 3 complexes sont présents avec une majorité de complexes C2 et C3 (soit 2 et 3 Ku). Pour les concentrations plus élevées (de 30 à 90 nM), les complexes C2 et C3 restent majoritaires (figure 76 a).

Après une incubation de 30 min à 4°C, les 3 complexes C1, C2 et C3 sont observés à partir de 7,5 nM de Ku ; C3 est alors très discret. En fait, il faut une concentration de 30 nM de Ku pour voir clairement le complexe C3 et 45 nM de Ku pour que C2 et C3 deviennent les complexes majoritaires. Par comparaison au gel précédent, on constate aussi que la bande d'ADN nu disparaît plus tradivement. Il y a donc un décalage des retards en gel lorsque le temps d'incubation est plus long (figure 76 b). Les 3 complexes sont toujours présents mais lorsque le temps d'incubation augmente à 4°C il faut d'avantage de protéine Ku (90 nM au lieu de 30 nM) pour que la saturation de l'ADN soit majoritaire (complexe C3). De

la même manière pour un temps d'incubation plus long, à 4°C, il faut augmenter la concentration de Ku pour que toutes les molécules d'ADN soient complexées avec Ku (60 nM au lieu de 30 nM).

Nous démontrons ainsi qu'à 4°C la fixation de Ku sur les extrémités est très rapide puisque pratiquement toutes les molécules d'ADN sont engagées dans des complexes à 15 nM, 15 min (C3 et C2 majoritaire). Cependant Ku se décroche aussi rapidement puisque pour la même concentration de Ku au bout de 30 mn on visualise une proportion non négligeable d'ADN libre. Les protéines Ku « s'enfilent » depuis les extrémités (C1 et C2) et remplissent l'ADN (C3 : saturation) et sortent. Pour un temps court d'incubation (15 mn) à 4 °C et pour de faibles concentrations (jusqu'à 15 nM) on peut visualiser l'accroche de Ku aux extrémités, au-delà de 15 mn même pour de faibles concentrations on visualise autant l'accroche de Ku aux extrémités que son « décrochage ».



*Figure 77 : Fixation de l'héterodimère Ku70/Ku80 sur l'ADN (70pb) à 25°C* Gel retard : gel d'agarose 2% TBE 0.5X, ADN 70 pb marqué Cy5 à 7,5 nM molécules, Ku70/Ku80 (0nM, 7,5 nM, 15 nM, 30 nM, 45 nM, 60 nM, 75 nM et 90 nM). a : incubation des complexes 15 min à 25°C, b : incubation des complexes 30 min à 25°C. L'ADN marqué est révélé à l'aide d'un typhoon gel imaging system (GE Healthcare).

Après une incubation de 15 min à 25°C, deux complexes C1 et C2 sont aussi formés à 7,5 nM de Ku. A 15 nM de Ku, les 3 complexes apparaissent mais il faut atteindre une concentration de 45 nM pour que les complexes C2 et C3 soient majoritaires. A 60 nM de Ku il n'y a pratiquement plus d'ADN libre. Il est à noter qu'à partir de 30 nM de Ku, on observe un dédoublement de la bande C1 qui pourrait correspondre à deux positions différentes de la protéine Ku sur l'ADN puisque Ku entre par les extrémités puis glisse sur l'ADN (figure 77 a).

Après une incubation de 30 min à 25 °C, le gel ressemble beaucoup à celui obtenu à 15 mn d'incubation. Les 3 complexes C1, C2 et C3 sont présents à partir de 15 nM de Ku et il faut 45 nM de Ku pour que les complexes C1 et C2 soient clairement majoritaires. De la même manière, à partir de 45 nM de Ku, on observe un dédoublement de la bande C1 (figure 77 b). Cependant II faut remarquer qu'à 30 mn d'incubation par rapport à 15 mn, la différence réside essentielle dans la présence non négligeable d'ADN pour toutes les concentrations. Nous remarquons également que les gels obtenus à 15 mn à 25°C et à 30 mn à 4°C sont très similaires. A 25 °C même pour des temps courts (15 mn) et de faibles concentrations (<à 15 nM) il y a plus de Ku qui se déstabilise (décrochage de l'ADN) que de Ku qui s'accroche aux extrémités.



*Figure 78 : Fixation de l'héterodimère Ku70/Ku80 sur l'ADN (70pb) à 37°C* Gel retard : gel d'agarose 2% TBE 0.5X, ADN 70 pb marqué Cy5 à 7,5 nM molécules, Ku70/Ku80 (0nM, 7,5 nM, 15 nM, 30 nM, 45 nM, 60 nM, 75 nM et 90 nM). a : incubation des complexes 15 min à 37°C, b : incubation des complexes 30 min à 37°C. L'ADN marqué est révélé à l'aide d'un typhoon gel imaging system (GE Healthcare).

Enfin, après une incubation de 15 min à 37°C, les deux complexes C1 et C2 sont formés à 7,5 nM de Ku (figure 77 a). A 15 nM de Ku, les 3 complexes apparaissent avec une majorité de complexes C1 et C2 par rapport à C3 mais ils restent minoritaires par rapport à la quantité d'ADN nu. A 30 nM de Ku, les complexes C2 et C3 sont majoritaires. Nous notons que la proportion de complexe C1, même si elle reste minoritaire par rapport à C2 et C3 à partir de 30 nM de Ku, reste importante. Ce complexe ne disparait jamais.

Après une incubation de 30 min à 37 °C, les 3 complexes C1, C2 et C3 apparaissent à des concentrations en Ku plus importantes (30 nM) et la quantité de chacun de ces complexes est globalement plus faible puisque la bande correspondant à l'ADN libre est plus forte

(figure 77 b). Ainsi les quantités des complexes C2 et C3 observées à 37°C pour 30 mn d'incubation sont plus faibles que celles obbtenues pour les conditions 37°C et 15 mn d'incubation. Nous montrons que cette proportion de complexes est même plus faible que les proportions observées pour les mêmes concentrations à 4°C et 25°C pour 10 et 30 mn d'incubation. Nous pensons que ces gels à 37°C sont caractéristiques d'un mécanisme dynamique trop rapide pour pièger l'étape de départ à savoir l'accroche de Ku aux extrémités.

Cette analyse nous permet de comprendre les conditions de chargement de Ku sur l'ADN et surtout sa stabilité sur l'ADN. Nous mettons en évidence une déstabilisation des complexes au cours du temps. Cette déstabilisation est renforcée à 37°C et est minimisée à 4°C.

La protéine Ku joue un rôle central dans le NHEJ car non seulement elle protége les extrêmités mais elle constitue une plateforme de recrutement des partenaires, d'abord du complexe de maturation puis du complexe de ligation, même si cette séparation des complexes n'est plus aussi claire. Le laboratoire a précedemment étudié le comportement de Ku et de son rôle dans le modèle de *Bacillus subtilis* en caractérisant ses propriétés de reconnaissance des extrêmités et de glissement pour envahir de grande longueur d'ADN (119).

Nous avons donc également étudié le comportement de Ku humain sur des fragments plus long de 200 pb. Si on considère que Ku couvre en moyenne 20 pb, en théorie pas plus de 10 hétérodimères peuvent se charger sur l'ADN.

Au regard des résultats obtenus avec les fragments de 70 pb, nous avons d'abord exploré le temps d'incubation court (15 mn) et les températures d'incubation 4°C et 25°C pour des concentrations de 7,5 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 ; 75 et 90 nM de Ku (figure 79). Les échantillons sont déposés sur deux gel d'agarose 0,8 % TBE 0.5X et soumis à un champ électrique de 56 mA. L'ADN marqué est révélé à l'aide d'un Typhoon Gel Imaging System (GE Healthcare) (figure 79).



*Figure 79 : Fixation de l'héterodimère Ku70/Ku80 sur un ADN de 200pb* Gel retard : gel d'agarose 0,8% TBE 0.5X, ADN 200pb marqué Cy5 à 7,5 nM molécules, Ku70/Ku80 (0nM, 7,5 nM, 15 nM, 30 nM, 45 nM, 60 nM, 75 nM et 90 nM). a : inubation des complexes 15 mn à 4°C, b : incubation des complexes 15 mn à 25°C. L'ADN marqué est révélé à l'aide d'un typhoon gel imaging system (GE Healthcare).

Après une incubation de 15 mn à 4°C, de nombreux complexes apparaissent déjà à 7,5 et à 15 nM (C1, C2, C3, C4, C5) alors que nous sommes à une concentration d'ADN de 7,5 nM molécules, soit 15 nM en extrèmités. A 30 nM on voit déjà apparaître jusqu'à 7 complexes différents et les complexes saturés (correspondants à 10 Ku par ADN) apparaissent à 45 nM. Compte tenu de la résolution du gel, on ne sépare pas vraiment les complexes 7, 8, 9 et 10. On constate qu'il reste même pour les concentrations les plus fortes de Ku (de 60 à 90 nM), toujours de l'ADN libre. Rappelons que 60 nM ne correspond qu'à 8 fois plus de molécules de Ku que de molécules d'ADN. C'est insuffisant pour saturer (couvrir tous les ADNs sur leur longueur) toutes les molécules d'ADN. Il faudrait 10 fois plus de Ku que de molécule d'ADN soit une concentration de 75 nM.

Pour le fragment de 70 pb on observait la même situation, la concentration étant suffisante pour couvrir l'ensemble de l'ADN. Cela nous a permis de conclure à des mécanismes de déstabilisation de Ku. Mais sur le fragment de 200pb, la cohabitation de molécules d'ADN entièrement couverte de Ku avec des molécules d'ADN nu, nous permet de montrer que la fixation de Ku aux extrémités est un phénomène coopératif.

L'incubation de 15 mn à 25 °C permet d'obtenir les mêmes résultats qu'à 4°C. Sur des fragments longs et des temps courts les températures 4°C et 25°C semblent comparables. Nous avons choisi ensuite d'explorer des incubations à des temps plus courts que 15 mn puisque nous avons vu, dans les conditions précédentes, surtout pour les fragments de 70

pb, que les complexes ont tendance à se déstabiliser entre 15 et 30 mn. Nous avons donc choisi de vous présenter le résultat pour un temps d'incubation de 5 mn.

Après 5 mn d'incubation, les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose 0,6 % TBE 0.5X et soumis à un champ électrique de 56 mA. L'ADN marqué est révélé à l'aide d'un Typhoon Gel Imaging System (GE Healthcare) (figure 80).



*Figure 80 : Fixation de l'hétérodimère Ku70/Ku80 sur un ADN de 200pb pour un temps court d'incubation* Gel retard : gel d'agarose 0,6 % TBE 0.5X, ADN 200 pb marqué Cy5 à 7 nM molécules, Ku70/Ku80 (0 nM, 8 nM, 16 nM, 32 nM, 64 nM, 128 nM et 256 nM). L'ADN marqué est révélé à l'aide d'un typhoon.

En présence de Ku à 8 nM et à 16 nM, on observe l'apparition de 3 voire 5 complexes avec une population majoritaire du complexe appelé ici C2. A 32 nM et 64 nM on voit apparaître les complexes plus élévés comprenant de 7 à 9 hétérodimères de Ku. Il n'y a plus d'ADN libre à partir de 128 nM et tous les ADNs sont recouverts presque totalement de protéine Ku pour 256 nM de Ku. Il n'y a pas de déstabilisation de la protéine Ku.

Les dédoublements des bandes régulièrement observés, très visibles pour les complexes C1, C2, C3, C4, C5 et C6, interrogent sur leurs origines. Signent-ils la présence d'un hétérodimère supplémentaire ou marquent-ils une position différente de la protéine sur l'ADN pour un même complexe ? Au dela des complexes C7, il est difficile de savoir si on a plusieurs bandes puisqu'on atteint la limite de la résolution du gel.

### b- Complexes ADN-Ku en TEM et AFM

Pour mieux comprendre l'organisation des complexes, nous avons utilisé l'imagerie en MET et en AFM. Pour les études en MET, 7,5 nM molécules d'ADN db linéaire de 400 pb sont incubées avec 50 nM de Ku70/Ku80 dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 50 mM. Après 5 mn d'incubation à 25°C, 5  $\mu$ l d'échantillon sont déposés sur une grille avec la méthode de coloration positive puis observés en mode fond noir. Pour l'analyse en AFM, les complexes sont préparés dans les mêmes conditions utilisées en MET. 5  $\mu$ l d'échantillon sont déposés un mica fraichement clivé et traité avec de la spermidine (voir matériels et méthodes).

Les deux approches (MET et AFM) nous permettent de visualiser les complexes ADN-Ku formés. En présence de Ku à 50 nM on observe différents complexes nucléoprotéiques totalement ou partiellement recouverts par Ku. Les molécules de Ku se chargent sur les extrémites de l'ADN et glissent le long de l'ADN (figure 81 b, d).



Figure 81 : Chargement de Ku70/Ku80 sur l'ADN en TEM et AFM

a, b : Images en MET, a : 7,5 nM molécules d'ADN 400 pb, b : 7,5 nM molécules ADN 400pb incubés avec 50 nM de Ku70/Ku80 c, d : Images en AFM c : 7,5 nM molécules d'ADN 400 pb, d : 7,5 nM molécules d'ADN 400pb incubés avec 50 nM de Ku70/Ku80.

L'observation des complexes en AFM nous permet de visualiser très clairement la fixation de Ku aux extrémités et la diffusion de Ku le long de l'ADN. Ce type d'imagerie rend possible la caractérisation des complexes en termes de nombre et de positionnement. On peut aussi visualiser la couverture totale du fragment d'ADN par Ku.

La visualisation des complexes ADN-Ku en MET et AFM montre clairement un comportement coopératif de Ku sur l'ADN (400pb), comme cela avait été préalablement montré par le laboratoire pour Ku humaine (non publié) et pour Ku de *B. Subtilis* (119). En effet, on observe une population d'ADN totalement couvert par Ku alors qu'il reste encore des ADNs totalement libres pour une concentration de Ku bien inférieure à la concentration de saturation.

### b1- La fixation de Ku est coopérative

Nous avons incubé 2,8 nM de plasmide pUC19 linéarisé par l'enzyme de restriction XbaI et 24 nM de protéine Ku dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 50 mM pendant 5 mn à 25°C. L'échantillon est déposé sur la grille par la technique de coloration positive, puis observé en fond noir sur le microscope Zeiss 912.



*Figure 82 : Image en MET de complexe Ku-ADN* Ku à 24nM est incubé avec 2,8 nM molécules de pUC19 linéarisé dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8 NaCl 50 mM et observé en TEM à un grossissement de 50 000. La barre correspond à 100 nm

Cette expérience présentée ici à juste pour objet de montrer la coopérativité qui intervient lors de la fixation de Ku sur l'ADN. On peut voir sur ce type de photo des molécules d'ADN nues (figure 82 : flèches rouges), des molécules d'ADN avec quelques protéines Ku (figure 82 : flèches vertes) et des molécules d'ADN entièrement recouvertes par Ku (figure 82 : flèche blanche). Ces photos permettent de proposer un modèle coopératif dans la fixation de Ku sur l'ADN, ce qui renforce les observations en gel où on observe des complexes C4, C5, C6 jusqu'à C10 alors qu'il reste des molécules libres d'ADN.



Figure 83 : Zoom sur les complexes Ku-ADN

Ku à 24nM est incubé avec du 2,8 nM molécules de pUC19 linéarisé da*ns un tampon Tris HCl 10 mM pH 8* NaCl 50 mM et obervé en TEM à un grossissement de 50 000. La barre correspond à 100 nm. A : Molécule d'ADN nu, B : Molécules d'ADN avec 2 Ku liés, C-D : molécules d'ADN pratiquement entièrement couvertes par Ku. Barre d'échelle = 100 nm

La figure 83 illustre le chargement de Ku aux deux extrémités (B) et le glissement des proteines tout le long de l'ADN par le chargement successif à partir des extrémités, la partie d'ADN nu au centre réprésente la partie non occupée par l'un ou l'autre des envahissements depuis les extrémités par Ku. On peut noter que les longueurs d'envahissement depuis les extrémités (C et D) sont asymétriques, ce qui signe là encore un mécanisme coopératif de recrutement de Ku.

### b2- Positionnement de Ku sur l'ADN en AFM

Les complexes ADN-Ku obtenus dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la MET sont visualisés individuellement et classés en fonction de nombre de molécules de Ku détectées (figure 84).



*Figure 84 : Analyse du positionnement de Ku le long de l'ADN en AFM* 7,5 nM molécules d'ADN 400 pb incubés avec 50 nM de Ku70/Ku80 a-d : positionnement d'une molécule de Ku sur l'ADN, e-h : positionnement de 2 molécules de Ku le long de l'ADN, i-k : positionnement de 3 molécules de Ku le long de l'ADN, l-s : positionnement de plus de 3 molécules de Ku sur l'ADN, t : saturation du fragment d'ADN.

La visualisation en AFM montre que les protéines Ku interagissent bien avec les extrémités. Elles ne restent pas fixées aux extrémités d'ADN (figure 84), mais l'anneau qu'elles forment glisse ensuite le long de l'ADN. Le chargement de Ku peut se faire depuis une seule ou depuis les deux extrémités libres d'ADN (a et e). Ces figures sont un panel d'observations pour une condition. Les images de a à d montrent des « complexes 1» avec la reconnaissance d'une des extrémités et le glissement par diffusion à l'intérieur de l'ADN avec des positions diverses. Les images de e à h montrent des « complexes 2 » avec la

reconnaissance aux deux extrémités et le glissement d'un ou des deux hétérodimères vers l'intérieur de l'ADN depuis une ou deux extrèmités. Les figures i à k représentent des « complexes 3 » avec aussi des positions différentes des hétérodimères le long de l'ADN. Les figures de l à r montrent une diversité de complexes de 4 à plus de 10 hérérodimères chargés sur l'ADN. Les figures s et t illustrent une saturation complète des fragments mais il reste difficile de dénombrer les hétérodimères de Ku.

Ces études du chargement de Ku nous ont permis de derterminer les conditions de chargement, en montrant qu'en utilisant des temps très courts, le chargement est rapide et met en jeu de la coopérativité. Cette coopérativité fait probablement intervenir des interactions entre hétérodimères et nous proposons que ceux-ci interviennent lorsque Ku est en interaction avec l'extrémité 5' ou 3' de l'ADN. Ensuite ces interactions ne sont plus présentes lorsque Ku glisse sur l'ADN. Cette proposition suggère donc un changement de conformation de l'hérodimère au moment du chargement. Une étude au laboratoire dans le cadre d'un Master 2 par Camille Lecardonnel avait permis de montrer que Ku se chargeait sur l'ADN avec plus d'affinité quand l'extrémité présentait une extrémité 5' ou 3' de 4 nucléotides sortants par rapport à une extrémité à bout franc.

Ainsi les différents complexes formés résultent de deux événements très disctincts, l'interaction avec l'extrémité et le glissement libre par diffusion le long de l'ADN. Ces résultats sont très similaires à ceux obtenus avec Ku de *B. Subtilis* présenté dans l'article de McGovern *et al.*, et réalisé pour la partie microscopie au laboratoire par Sonia Baconnais (119). Contrairement à ce dernier, nous n'avons pas observé ou très peu de bridges et pas de phénomènes d'agrégation comme nous l'avons présenté dans cet article.

# IV-2- Interaction du complexe ADN-Ku avec XLF et XRCC4

L'hétérodimère Ku70/Ku80 reconnait les extrémités d'ADN et constitue une plateforme de recrutement de plusieurs facteurs du NHEJ : du complexe de maturation d'une part et surtout du complexe de ligation au travers d'interactions soit avec XRCC4-LIG4 ou avec XLF. Ces dernières années des interactions ont été mises en évidence entre l'hétérodimère Ku et un motif KBM (Ku Binding Motif) de plusieurs protéines impliquées dans la réparation par la voie NHEJ. Un motif de liaison de Ku (KBM) localisé à l'extrémité C-ter du XLF (X-KBM) a été décrit. Ce motif permet l'interaction de XLF avec le complexe ADN-Ku. Fait intéressant, Ku interagit également avec un certain nombre de facteurs NHEJ accessoires dont APLF à travers un KBM (A-KBM) qui est situé dans la région

centrale de cette protéine. Il a éte montré que l'interaction Ku-APLF facilite le recrutement de XRCC4 sur les cassures d'ADN, ce qui participerait à l'assemblage des acteurs du NHEJ.

Ku s'associe également à la protéine du syndrome de Werner (WRN) qui par ses activités hélicase et exonucléase, est impliqué dans de nombreux aspects du métbolisme de l'ADN dont le NHEJ. Récemment PAXX (Paralog of XRCC4 and XLF) a été montré comme interagissant avec Ku à travers un motif qui se trouve dans sa region C-ter. La figure 85 résume les différents motifs KBM qui interagissent avec Ku.



Figure 85 : Les motifs KBM impliqués dans l'interaction avec Ku d'après Némoz et al. 2018

A l'exception de PAXX qui interagit avec la sous unité Ku70 de l'htérodimère Ku, les autres protéines interagissent avec la sous unité Ku80. La présence de plusieurs protéines impliquées dans la réparation des CDBs qui interagissent avec une même sous unité soulève des questions sur le mécanisme régulant leurs recrutements. Récemment, les travaux de Clement Nemoz *et al.* en cristallographie montre que les motifs X-KBM et A-KBM se lient à des sites distants du domaine Ku80  $\alpha$  /  $\beta$  (dans l'espace 3D). Le motif X-KBM occupe une poche interne de Ku formée après une grande rotation vers l'extérieur du domaine Ku80  $\alpha$  / $\beta$  (figure 86)



*Figure 86 : Structures cristallographiques des complexes ADN-Ku-X-KBM et ADN-Ku-A-KBM* Figure d'après Némoz et al. 2018

Nous avons donc décidé d'explorer l'interaction de Ku avec XRCC4 et avec XLF pour caractériser l'assemblage entre le complexe de reconnaissance et le complexe de ligation. Sachant que  $XLF_{FL}$  et  $XRCC4_{FL}$  seuls intéragissent avec l'ADN, il est indispensable de travailler avec des complexes ADN-Ku totalement couvert. Nous avons mis en place un protocole qui consiste à former des complexes en condition de saturation et ensuite à bloquer Ku à l'intérieur des molécules d'ADN à l'aide d'un couple biotine-streptavidine à chaque extrémité et enfin à purifier et à sélectionner les complexes totalement couverts.

a- Préparation du complexe ADN-Ku bloqué sur l'ADN par la streptavidine

On utilise un ADN db de 500pb que nous avons obtenu par PCR sur le plasmide pBR322 (région 2576 et 4016) avec des amorces biotinylées. Nous incubons 116 nM molécules d'ADN avec 10  $\mu$ M de protéine Ku dans un tampon Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 50 mM pendant 5 mn à 25°C dans un volume de 28  $\mu$ l, puis nous ajoutons 8  $\mu$ l de streptavidine fraîchement reconstituée pour avoir une concentration finale à 6  $\mu$ M pendant 15 mn toujours à 25°C. On purifie ces complexes sur une colonne de chromatographie superose 6 increase (GE Healthcare). Les fractions attendues sont éluées dans le volume exclu et les complexes sont vérifiés en MET (figure 87).



Figure 87 : Schéma résumant la formation de complexe ADN-Ku-streptavidine

#### Rendement et stabilité des complexes ADN-Ku-streptavidine

Dans ces essais, nous n'obtenons que 40% des molécules qui sont recouvertes. Nous avons vérifié la stabilité du complexe sur plusieurs jours puisque la liaison biotine streptavidine est très forte. On a déposé 5  $\mu$ l de la réaction éluée, 30 mn après purification sur des grilles de microscopie en vue d'un suivi au MET du complexe ADN-Ku-streptavidine, puis nous avons renouvellé l'opération 24 heures et enfin 96 heures après sa purification. Pour réaliser cette analyse nous avons choisi de compter le nombre de complexes ADN-Ku présent par  $\mu$ m<sup>2</sup> sur la grille de microscopie au cours du temps (figure 88).



Figure 88 : Le complexe ADN-Ku-Streptavidine est stable au cours du temps

Nous constatons que si on représente le nombre de complexe ADN-Ku-streptavidine par  $\mu m^2$  en fonction du temps, on peut faire passer une droite de corrélation linéaire avec une pente proche de 0 et un coefficient de corrélation de 0,88. L'échantillon ne varie pas dans le temps.

Si cette fois on regarde le nombre de complexe par rapport au nombre de molécules d'ADN nu au cours du temps nous constatons également que ce rapport est très stable au cours du temps. Nous avons un système qui permet de bloquer Ku sur l'ADN de façon stable au cours du temps.

b- XLF bridge les complexes ADN-Ku en présence du domaine KBM

Il a été montré que XLF via son domaine KBM interagit avec Ku en présence d'ADN (226). Dans les cellules, l'analyse du recrutement de XLF en microscopie à fluorescence montre que la suppression des acides aminés codant pour le motif KBM empêche l'accumulation de XLF au niveau des CDBs induites par le laser (228). Pour déterminer si l'interaction de Ku avec XLF dépend la présence du domaine KBM, nous avons analysé l'interaction du complexe ADN-Ku avec XLF<sub>FL</sub> ou XLF<sub>224</sub> dépourvu du domaine KBM. L'implication de Ku dans le recrutement de XRCC4 au niveau des CDBs n'est pas

clairement établie. Les données existantes sont des preuves indirectes d'une potentielle interaction (203). Contrairement à XLF aucun domaine d'interaction avec Ku n'est caractérisé au niveau de XRCC4. Les complexes ADN-Ku-streptavidine purifiés précédemment sont incubés avec soit XRCC4<sub>FL</sub>, XLF<sub>FL</sub> ou XLF<sub>224</sub> dans un tampon Tris HCl 20 mM pH 8 NaCl 50 mM (figures 89-90). Un volume de 5  $\mu$ l de la réaction est déposé sur une grille avec la méthode de coloration positive puis observé en mode fond noir et 5 autre  $\mu$ l sont déposés sur une grille avec la méthode de coloration négative puis observés en mode fond clair.



*Figure 89 : XLF bridge les complexes ADN-Ku-streptavidine en présence du domaine KBM* A-B, E-F : images de coloration positive en fond noir, C image de coloration négative en fond clair, G image de coloration positive en fond clair en utilisant un marquage avec des billes d'or. D et H représentation schématique, I histogramme du nombre de bridges en présence de XLF, XLF<sub>224</sub> et X4. Barres d'échelle = 50 nm.

Les complexes ADN-Ku bloqués avec la streptavidine sont analysés par MET dans les deux modes d'imagerie (figure 54 B, C).



*Figure 90 : Résumé des essais pour caractériser l'interaction des complexes ADN-Ku-streptavidine avec XRCC4 et XLF* 

Seuls les complexes Ku-ADN complètement couverts sont considérés. En présence de XLF, on observe des structures de bridges avec deux complexes ADN-Ku-streptavidine ou plus (figure 54 E, F). La présence de XLF au niveau de ces bridges est confirmée par une approche de marquage de XLF avec des billes d'or. 600 molécules sont analysées pour chaque condition, les complexes bridgés sont quantifiés. Un niveau basal (8%) d'événements de bridge est observé dans le contrôle (complexe ADN-Ku-streptavidine seul). En présence de XLF on observe une augmentation (44%) des événements de bridges observés. En absence du domaine KBM (avec XLF<sub>224</sub>), on observe une diminution des événements de bridges observés (11%), valeur proche du contrôle.

Ces résultats suggèrent que XLF bridge les complexes ADN-Ku en présence du domaine KBM. La même étude en présence de XRCC4 a été réalisée et nous retrouvons un pourcentage proche du contrôle à savoir 11%. Ces résultats montrent que XRCC4 ne bridge pas les complexes ADN–Ku.

Pour conclure nous avons montré que XLF bridge les complexes ADN-Ku en présence du domaine KBM. Alors que  $XRCC4_{FL}$  n'est pas impliqué dans le bridge de ces complexes. Nous avons précédement montré que XLF peut être présent dans le filament XRCC4. La dynamique du filament XRCC4 permet facilement l'incorpartion de XLF en fonction de sa concentration locale.

Il est donc fortement probable que XLF, par sa capacité à interagir avec la plateforme de recrutement Ku d'une part et avec le filament XRCC4 d'autre part puissent être l'acteur central du lien entre le complexe de reconnaissance et le complexe de ligation (XRCC4 étant en interaction avec la Ligase IV au nivaux des CDBs).

### c- Les filaments XRCC4-XLF interagissent avec le complexe ADN-Ku

Nous avons donc étudié ces interactions dans des conditions qui permettent d'obtenir les filaments mixtes XRCC4-XLF. Nous avons utilisé les conditions qui permettent d'obtenir un mélange de complexes ADN-Ku-streptavidine et ADNnu-streptavidine. Ce mélange est incubé en présence de 100 nM de XRCC4<sub>FL</sub> seul ou 100 nM du complexe XRCC4-XLF. Un volume de 5  $\mu$ l d'échantillon est déposé sur une grille avec la méthode de coloration positive puis observé en mode fond noir.



Figure 91: Les filaments XRCC4-XLF interagissent avec le complexe ADN-Ku

A-B : les filaments XRCC4 interagissent seulement avec les ADN nus C-D : Les filaments mixtes XRCC4-XLF sont capables d'interagir avec les complexes ADN-Ku-streptavidine.

L'analyse des images en MET montre que les filaments  $XRCC4_{FL}$  interagissent avec l'ADN mais n'interagissent pas avec le complexe (ADN-Ku) (figure 91 A-B). Alors que les filaments mixtes XRCC4-XLF interagissent avec l'ADN mais peuvent également interagir avec le complexe (ADN-Ku) (figure 91 C, D).

Nous montrons dans cette étude que l'interaction entre le complexe de reconnaissance et les acteurs du complexe de ligation passe par XLF qui est intégré dans le filament XRCC4.

### **IV- 3- Discussion**

Dans ce chapitre, nous avons initialement caractérisé l'interaction de l'hétérodimère Ku70/Ku80 avec l'ADN en gel retard. On a pu mettre en evidence les différents complexes ADN-Ku issus de la fixation de plusieurs protéines Ku sur l'ADN. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà publiés sur la caractérisation du complexe ADN-Ku en utilisant d'autres fragments d'ADN (206)(208)(209). La complémentarité des gels retard, de la microscopie electronique et de l'AFM a permis de monter des complexes ADN-Ku ayant le même nombre de molécules de Ku mais positionnées différemment sur l'ADN (dédoublement de bandes en gel), comme cela avait été proposée précédemment dans les études réalisées par Peter R. Blier et al. (206). Dans ces études, ils ont aussi observé un dédoublement de bande en utilisant d'autres fragments d'ADN (31 pb, 166 pb, 299 pb et 445 pb). L'analyse des complexes en MET et en AFM nous a permis de caractériser plus précisément les complexes ADN-Ku formés. Nos analyses en microscopie électronique montrent qu'indépendamment de la taille de l'ADN, de la concentration de Ku et du temps d'incubation, on n'observe pas la circularisasion des molécules d'ADN en présence de Ku. Nous n'avons pas non plus observé d'interactions entre molécules d'ADN par leurs extrémités contrairement à ce qui est suggéré par Cary, R B et al. (463) qui analyser les complexes ADN-Ku en AFM.

A travers nos essais nous ne validons pas l'hypothèse que Ku est impliquée dans le maintien des extrémités d'ADN proches en vu de leur ligation, et nous n'observons pas de mécanismes de bridging permettant de rapprocher les extrêmités comme cela a été observé au laboratoire, dans les mêmes conditions d'analyse, pour l'homodimère de Ku bactérien (119). Il existe donc une vraie différence de comportement entre les Ku bactériennes et les Ku eucaryotes (levures et mammifères, au moins) qui ont des régions C-ter et N-ter plus étendues.

Les complexes ADN-Ku observés en AFM sont classés dans des catégories en fonction du nombre de molécules de Ku distinguées. Dans chaque catégorie on observe une distribution très hétérogène de Ku le long de l'ADN. Le glissement de Ku sur l'ADN permet à plusieurs molécules de Ku de se lier à l'ADN linéaire jusqu'à saturation. La structure de Ku en anneau qui entoure l'ADN et la présence d'interactions labiles entre Ku et le squelette sucre-phosphate de l'ADN lui permettent de glisser librement le long de l'ADN (255).

L'étude du chargement de Ku sur l'ADN en utilisant un long fragment d'ADN (2686 pb) nous permet de mieux mettre en évidence la fixation coopérative de Ku à partir des extrémités.

Nous avons ensuite bloqué les molécules de Ku à l'intérieur de l'ADN avec le complexe biotine-streptavidine (Kd de l'ordre de 10<sup>-14</sup> mol/L) pour obtenir la saturation et étudier le recrutement des partenaires du complexe de ligation (XLF et XRCC4) par le complexe ADN-Ku. Plusieurs études suggèrent que Ku est impliqué dans le recrutement des partenaires du complexe de ligation. Des essais *in vitro*, d'interaction du complexe XRCC4-Ligase IV (X4L4) avec l'ADN sur gel retard montre que l'interaction du complexe X4L4 avec l'ADN nécessite la présence de Ku (231). Une interaction protéine-protéine est caractérisée entre Ku et le premier motif BRCT de la Ligase IV, cette interaction est renforcée en présence de XRCC4 et de l'ADN double brin (229)(230). L'étude de la cinétique de recrutement des protéines impliquées dans la réparation des CDBs montre que l'accumulation de XRCC4-Ligase IV sur les DSBs dépend de la présence de Ku70/Ku80 (203). L'hétérodimère Ku70/Ku80 interagit avec le domaine C-ter de XLF et cette interaction nécessite la fixation de Ku sur l'ADN (227)(228).

Les études sur l'interaction de XLF et XRCC4 avec le complexe ADN-Ku ont toujours été interprétées en partant du principe que les molécules d'ADN ne sont pas totalement couvertes par Ku, sans tenir compte de fait que Ku glisse le long de l'ADN. Nous avons montré que XLF interagit avec Ku en interaction avec l'ADN et cette interaction n'est pas limitée aux protéines Ku à l'extrémité. Nous avons montré aussi que le bridge des complexes ADN-Ku par XLF est dépendant de la présence du domaine KBM de XLF, ce qui est en accord avec Ken-ichi Yano *et al.* qui montrent en visualisant l'accumulation de XLF au niveau des CDBs induites par microscopie à fluorescence dans les cellules, que le recrutement de XLF nécessite le motif KBM (228). Il est probable que l'interaction de XLF avec Ku nécessite non seulement le motif KBM mais aussi la présence de l'ADN
juste à côté de Ku. Ceci est rendu possible par le glissement de Ku sur l'ADN, même quand les complexes nous paraissent saturés.

XLF a émergé comme le partenaire qui est impliqué dans la recrutement de XRCC4 et Ligase IV au niveau des CDBs. Nous avons montré que XLF interagit aussi avec XRCC4 et que le complexe XRCC4-XLF forme un filament. Nous avons montré pour la première fois que le complexe ADN-Ku interagit avec le filament mixte XRCC4-XLF alors qu'aucune interaction n'est détectée entre le complexe ADN-Ku et le filament XRCC4 seul. Ces résultats montrent que XLF au sein du filament mixte XRCC4-XLF interagit avec le complexe ADN-Ku et recrute ainsi XRCC4 au niveau des CDBs.

#### **D-** Conclusions et Perspectives

La mise en évidence de l'existence d'un filament XRCC4-XLF avec des protéines tronquées de leurs régions C-ter a généré des interrogations sur le rôle de ces structures filamenteuses. Depuis les premières publications en 2011, il est admis que ce qui est vrai pour les protéines tronquées, l'est aussi pour les protéines Full Length. Toutes les publications qui traitent du complexe de ligation de la voie NHEJ considèrent ces protéines en filament. Aucune structure cristallographie n'a été obtenue à ce jour ni de  $XRCC4_{FL}$ , ni de  $XLF_{FL}$ .

Le travail effectué au laboratoire a permis de montrer que si  $XLF_{FL}$  ne forme pas de filaments comme XLF tronqué d'ailleurs,  $XRCC4_{FL}$  forme des filaments alors que  $XRCC4_{157}$  ne formait pas de filaments. Nous avons determiné en coloration négative une structure à moyenne résolution du filament  $XRCC4_{FL}$  qui est hélicoïdale de chiralité gauche et nous sommes sur le point d'obtenir une structure haute résolution en CryoEM qui permettra probablement de mieux caractériser la variabilité de cette structure hélicoïdale.

Nous avons caractérisé les propriétés de polymérisation de XRCC4 en fonction de la concentration, du temps et de la température. Cette démarche a permis de montrer que l'ADN ou XLF favorisent la polymérisation du filament. L'ajout de XLF permet la formation des filaments mixtes XRCC4 –XLF. Les filaments XRCC4 ou XRCC4-XLF ne se forment pas autour de l'ADN comme cela est considéré (455)(456). L'ADN interagit le long du filament mais reste à l'extérieur. Il n'y a rien de comparable avec les nucléofilaments ADN-RAD51 impliqués dans la réparation des cassures double brin par la voie de la recombinaison homologue. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'interaction d'oligomères de XRCC4 ou XLF avec l'ADN et nous avons montré que les complexes formés sont des oligomères/polymères différents des filaments XRCC4 hélicoidaux. Ces polymères tout en gardant une dynamique importante, facilitant ainsi les mécanismes intervenants dans le métabolisme de l'ADN. Ces complexes sont de plus en plus décrits chez les Procaryotes et ches les Eucaryotes (447)(448)(449).

Ainsi les filaments XRCC4 apparaissent comme acteur d'architecture, capable d'intégrer XLF à l'intérieur du filament pour faire des filaments mixtes et non stoechiomériques, mais aussi capable de recruter l'ADN, peut-être pour maintenir celui-ci dans des domaines

nucléaires. Aucun lien ou simitude n'ont encore été fait entre XRCC4, la cohésine, la condensine, les microtubules nucléaires et la lamine et ce champ de recherche apparaît comme particulièrement pertinent. Le plus intéressant est le cas de la lamine qui forme des structures en filaments de 3,4 Å de diamètre et qui présentent une structure hélicoidale. Sa polymérisation est indépendante de la présence d'ATP. Les lamines se lient à un nombre important de complexes protéiques nucléaires et sont impliquées dans l'organisation nucléaire et cytosquelettique, l'organisation de la chromatine, la régulation des gènes, et la stabilité du génome. En particulier un lien est fait entre la présence des lamines et la capacité à recruter ou à sequestrer des protéines intervenant dans les voies de réparation des cassures double brin de l'ADN et dans le stress réplicatif (435)(464)(465)(466).



*Figure 92: La lamine nucléaire et les constituants du cytosquelette chez les mammifères* (a) Les Lamines ont été modélisés à la périphérie du noyau à l'aide de tomogrammes. (b) Comparaison entre les éléments cytosquelettiques qui montre les microtubules, l'actine, la vimentine et les lamines avec leurs diamètres respectifs. Barre d'échelle, 20 nm. Figure extraite de l'article de Turgay *et al. 2017* (467).

XRCC4 peut, peut-être incorporer d'autres partenaires qu'il reste à identifier, de manière comparable au nucléofilament RAD51 dont on sait aujourd'hui qu'il peut contenir différents partenaires comme Rad52, peut-être BRCA2, les paralogues 55-57 chez la levure ou RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 and XRCC3 chez l'homme, et même RAD 54.

Les événements de condensation montrés ici, médiés par l'ADN et/ou des interactions proteine-proteine montrent des structures spécifiques de « molecular crowding » qui vont dans le sens d'un rôle d'architecture au sein de domaines nucléaires. Ce type d'étude sera à considérer bien sûr dans l'avenir au sein de structures chromatiniennes.

Ainsi nous proposons que les filaments XRCC4 existent dans le noyau en absence de cassures de l'ADN où ils jouent un rôle dans l'architecture nucléaire. Ces filaments interagissent les uns avec les autres et forme un réseau de soutien structurant (figure 93). Des études sont actuellement en cours pour explorer l'hypothèse de l'existance des filaments XRCC4 dans la cellule en absence de cassures double brin.



Figure 93 : L'organisation des filaments XRCC4 en absence de CDBs

Après induction des CDBs dans la cellule, le maintien des extrémités d'ADN proches en vue de leur ligation est important pour éviter les translocations et les réarangments dans le génome. Notre hypothèse est que les filaments XRCC4 existants dans la cellule sont impliqués dans le maintien des extrémités des CDBs proches (figure 94).



Figure 94 : XRCC4 implique dans le maintien des extrémités d'ADN proches

Il a été montré que lorsque les cassures double brin interviennent et que la réparation est orientée vers la voie NHEJ, Ku reconnaît les extrémités et envahit la zone adjacente pour protéger l'ADN et former une plateforme de rectutement de la voie du NHEJ. Nous avons montré que XLF interagit avec Ku quand ce dernier est chargé sur l'ADN.

Après induction des CDBs, Ku se fixe aux extrémités des CDBs et initie la réparation par la voie NHEJ. L'analyse de recrutement des partenaires de la voie NHEJ montre un recrutement rapide de XLF au niveau des CDBs quelques secondes après leurs inductions (figure 95).



Figure 95: Recrutement de Ku au niveau des extrémités des CDBs

XLF s'intégre dans les filaments XRCC4 proches des CDBs et forment des filaments mixtes (XRCC4-XLF) (figure 96).



Figure 96: Intégration de XLF dans le filament XRCC4

Une étude en microsocpie à fluorescence à super réslution a récemment montré un assemblage de X4L4-XLF-ADN-Ku interprété comme une structure similaire à un filament (455).



Figure 97 : Interactions du complexe de reconnaissance et du complexe de ligation médiés par XLF

XRCC4 pourrait être recruté au niveau des CDBs par l'intermédiaire de XLF qui s'intégre dans le filament XRCC4 grâce à la dynamique de ce filament. Une fois intégré, XLF par son domaine KBM interagit avec Ku (figure 97). Ainsi XLF fait le lien entre le complexe de reconnaissance et le complexe de ligation, principalement XRCC4-Ligase IV. La Ligase IV peut alors intervenir dans l'étape finale. L'interaction forte entre ligase IV et XRCC4 permet d'emmettre l'hypothèse qu'elle soit incorporée dans le filament dans un ratio qui permettrait à XRCC4 de constituer l'architecture de base avec incorpration de quelques molécules de XLF et de Ligase IV pour effectuer le lien et l'étape de ligation.

# E- Annexes

#### Annexe 1

Fragments	Amorces	La séquence 5'→3'
d'ADN		
600 pb	Amorce 3184	CCTTAACGTGAGTTTTCGTTCC
	Amorce 2576	GGATCTCAACAGCGGTAACGACGCTCAAGTCAGAG G
800 pb	Amorce 3681	TGTAACTCGCCTTGATCG
	Amorce 2853	CCGGTAAGACACGACTTATCG
1440 pb	Amorce 4016	CGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCGGATCTCAAC AGCGGTA
	Amorce 2576	5'GGATCTCAACAGCGGTAACGACGCTCAAGTCAGA GG

Tableau 8 : Les amorces utilisées pour la synthèse des fragments d'ADN

Les numéros correspondent à la position des paires de base sur le plasmide pBR322 qui délimite la séquence amplifiée.

## Annexe 2

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	98°C	5 min
30 Cycles	95°C 57°C 68°C	30S 60S 45S
Extension finale	68°C	5 min
Conservation	4-10°C	

Tableau 9 : Conditions PCR pour un fragment d'ADN 1440pb

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	98°C	5 min
30 Cycles	95°C 57°C 68°C	30S 60S 90S
Extension finale	68°C	5 min
Conservation	4-10°C	

Tableau 10 : Conditions PCR pour un fragment d'ADN 800pb

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	98°C	308
	95°C	30S
30 Cycles	57°C	60S
	68°C	30S
Extension finale	68°C	5 min
Conservation	4-10°C	

Tableau 11 : Conditions PCR pour un fragment d'ADN 600pb

### F-Bibliographie

- 1. Hoeijmakers, J.H.J. (2009) DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.*, **361**, 1475–85.
- 2. Krokan,H.E. and Bjørås,M. (2013) Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, 1–22.
- 3. Schärer,O.D. (2013) Nucleotide excision repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**.
- 4. Li,Z., Pearlman,A.H. and Hsieh,P. (2015) DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst).*, **38**, 94–101.
- 5. Chapman, J.R., Taylor, M.R.G. and Boulton, S.J. (2012) Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol. Cell*, **47**, 497–510.
- 6. Lieber, M.R. (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 181–211.
- Xing,M., Yang,M., Huo,W., Feng,F., Wei,L., Jiang,W., Ning,S., Yan,Z., Li,W., Wang,Q., *et al.* (2015) Interactome analysis identifies a new paralogue of XRCC4 in non-homologous end joining DNA repair pathway. *Nat. Commun.*, 6, 6233.
- Ochi, T., Blackford, A.N., Coates, J., Jhujh, S., Mehmood, S., Tamura, N., Travers, J., Wu, Q., Draviam, V.M., Robinson, C. V., *et al.* (2015) PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science (80-. ).*, 347, 185–188.
- Ghezraoui,H., Piganeau,M., Renouf,B., Renaud,J.-B., Sallmyr,A., Ruis,B., Oh,S., Tomkinson,A.E., Hendrickson,E.A., Giovannangeli,C., *et al.* (2014) Chromosomal Translocations in Human Cells Are Generated by Canonical Nonhomologous End-Joining. *Mol. Cell*, 55, 829–842.
- 10. Pang, D., Yoo, S., Dynan, W.S., Jung, M. and Dritschilo, A. (1997) Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res.*, **57**, 1412–1415.
- Ramsden, D.A. and Geliert, M. (1998) Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: A direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *EMBO J.*, 17, 609–614.
- Hammel,M., Yu,Y., Mahaney,B.L., Cai,B., Ye,R., Phipps,B.M., Rambo,R.P., Hura,G.L., Pelikan,M., So,S., *et al.* (2010) Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial nonhomologous end joining complex. *J. Biol. Chem.*, 285, 1414–1423.
- Spagnolo,L., Rivera-Calzada,A., Pearl,L.H. and Llorca,O. (2006) Three-Dimensional Structure of the Human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 Complex Assembled on DNA and Its Implications for DNA DSB Repair. *Mol. Cell*, 22, 511–519.
- Reynolds, P., Anderson, J.A., Harper, J. V., Hill, M.A., Botchway, S.W., Parker, A.W. and O'Neill, P. (2012) The dynamics of Ku70/80 and DNA-PKcs at DSBs induced by ionizing radiation is dependent on the complexity of damage. *Nucleic Acids Res.*, 40, 10821–10831.
- Fujimori,A., Araki,R., Fukumura,R., Ohhata,T., Takahashi,H., Kawahara,A., Tatsumi,K. and Abe,M. (2000) Identification of four highly conserved regions in DNA-PKcs. *Immunogenetics*, **51**, 965–73.
- 16. Doré,A.S., Drake,A.C., Brewerton,S.C. and Blundell,T.L. (2004) Identification of DNA-PK in the arthropods. *DNA Repair (Amst).*, **3**, 33–41.
- Ropars, V., Drevet, P., Legrand, P., Baconnais, S., Amram, J., Faure, G., Márquez, J. a, Piétrement, O., Guerois, R., Callebaut, I., *et al.* (2011) Structural characterization of filaments formed by human Xrcc4-Cernunnos/XLF complex involved in nonhomologous DNA end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 12663–12668.

- 18. Davis, A.J. and Chen, D.J. (2013) DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl. Cancer Res.*, **2**, 130–143.
- 19. Ochi, T., Wu, Q. and Blundell, T.L. (2014) The spatial organization of non-homologous end joining: From bridging to end joining. *DNA Repair (Amst).*, **17**, 98–109.
- 20. Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P. and Georgakilas, A.G. (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **711**, 193–201.
- 21. Zeman, M.K. and Cimprich, K.A. (2014) Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.*, **16**, 2–9.
- 22. Mazouzi, A., Velimezi, G. and Loizou, J.I. (2014) DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Exp. Cell Res.*, **329**, 85–93.
- 23. Greinert, R., Volkmer, B., Henning, S., Breitbart, E.W., Greulich, K.O., Cardoso, M.C. and Rapp, A. (2012) UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10263–10273.
- 24. Siddiqi,M. a and Bothe,E. (1987) Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. *Radiat. Res.*, **112**, 449–463.
- Bertoncini, C.R. and Meneghini, R. (1995) DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3'-phosphoglycolate termini. *Nucleic Acids Res.*, 23, 2995–3002.
- 26. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, **17**, 1195–1214.
- 27. Garinis, G.A., Mitchell, J.R., Moorhouse, M.J., Hanada, K., de Waard, H., Vandeputte, D., Jans, J., Brand, K., Smid, M., van der Spek, P.J., *et al.* (2005) Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *EMBO J.*, **24**, 3952–62.
- 28. Mehta, A. and Haber, J.E. (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**.
- 29. Ciccia, A. and Elledge, S.J. (2010) The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell*, **40**, 179–204.
- 30. Liu,L.F., Duann,P., Lin,C.T., D'Arpa,P. and Wu,J. (1996) Mechanism of action of camptothecin. In *Annals of the New York Academy of Sciences*.Vol. 803, pp. 44–49.
- 31. Xu,Y. and Her,C. (2015) Inhibition of Topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA Damage Repair and Anticancer Therapy. *Biomolecules*, **5**, 1652–70.
- 32. Nishana, M. and Raghavan, S.C. (2012) Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology*, **137**, 271–281.
- Proudhon,C., Hao,B., Raviram,R., Chaumeil,J. and Skok,J.A. (2015) Long-Range Regulation of V(D)J Recombination. In *Advances in Immunology*.Vol. 128, pp. 123– 182.
- 34. Stavnezer, J., Guikema, J.E.J. and Schrader, C.E. (2008) Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.*, **26**, 261–92.
- Matthews, A.J., Zheng, S., DiMenna, L.J. and Chaudhuri, J. (2014) Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: Choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv. Immunol.*, 122, 1–57.
- 36. Keeney, S. (2008) Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn Stab*, **2**, 81–123.
- Pannunzio,N.R., Li,S., Watanabe,G. and Lieber,M.R. (2014) Non-homologous end joining often uses microhomology: Implications for alternative end joining. *DNA Repair (Amst).*, 17, 74–80.
- 38. Schipler, A. and Iliakis, G. (2013) DNA double-strand-break complexity levels and their

possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7589–7605.

- Andres, S.N., Schellenberg, M.J., Wallace, B.D., Tumbale, P. and Scott Williams, R. (2015) Recognition and repair of chemically heterogeneous structures at DNA ends. *Environ. Mol. Mutagen.*, 56, 1–21.
- 40. Henner, W.D., Rodriguez, L.O., Hecht, S.M. and Haseltine, W.A. (1983) gamma Ray induced deoxyribonucleic acid strand breaks. 3' Glycolate termini. *J. Biol. Chem.*, **258**, 711–713.
- 41. Angeloff,A., Dubey,I., Pratviel,G., Bernadou,J. and Meunier,B. (2001) Characterization of a 5???-aldehyde terminus resulting from the oxidative attack at C5??? of a 2-deoxyribose on DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1413–1420.
- 42. Dedon, P.C. (2008) The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 206–219.
- 43. Fromme, J.C. and Verdine, G.L. (2004) Base excision repair. *Adv. Protein Chem.*, **69**, 1–41.
- 44. Lieber, M.R. and Wilson, T.E. (2010) Nonhomologous DNA End Joining (NHEJ). *Cell*, **142**, 451–455.
- 45. Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T. and Liu, J. (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, **44**, 113–39.
- Pannunzio, N.R., Watanabe, G. and Lieber, M.R. (2017) Nonhomologous DNA End Joining for Repair of DNA Double-Strand Breaks. J. Biol. Chem., 10.1074/jbc.TM117.000374.
- 47. Chiruvella,K.K., Liang,Z. and Wilson,T.E. (2013) Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**.
- Shibata,A., Moiani,D., Arvai,A.S., Perry,J., Harding,S.M., Genois,M.M., Maity,R., van Rossum-Fikkert,S., Kertokalio,A., Romoli,F., *et al.* (2014) DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. *Mol. Cell*, 53, 7–18.
- 49. Ceccaldi, R., Rondinelli, B. and D'Andrea, A.D. (2016) Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.*, **26**, 52–64.
- 50. Aparicio, T., Baer, R. and Gautier, J. (2014) DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst).*, **19**, 169–175.
- 51. Cromie,G.A., Connelly,J.C. and Leach,D.R.F. (2001) Recombination at double-strand breaks and DNA ends: Conserved mechanisms from phage to humans. *Mol. Cell*, **8**, 1163–1174.
- Michel,B., Flores,M.-J., Viguera,E., Grompone,G., Seigneur,M. and Bidnenko,V. (2001) Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 8181–8188.
- 53. Costes, A. and Lambert, S. (2012) Homologous Recombination as a Replication Fork Escort: Fork-Protection and Recovery. *Biomolecules*, **3**, 39–71.
- 54. Kohl,K.P. and Sekelsky,J. (2013) Meiotic and mitotic recombination in meiosis. *Genetics*, **194**, 327–334.
- 55. Rocha,E.P.C., Cornet,E., Michel,B. and Bell,S.D. (2005) Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS Genet.*, **1**, e15.
- 56. Kadyk,L.C. and Hartwell,L.H. (1992) Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, **132**, 387–402.
- 57. Johnson, R.D. and Jasin, M. (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.*, **19**, 3398–407.

- 58. Puget, N., Knowlton, M. and Scully, R. (2005) Molecular analysis of sister chromatid recombination in mammalian cells. *DNA Repair (Amst).*, **4**, 149–161.
- 59. Moynahan, M.E. and Jasin, M. (1997) Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 8988–8993.
- 60. Försti, A., Louhelainen, J., Söderberg, M., Wijkström, H. and Hemminki, K. (2001) Loss of heterozygosity in tumour-adjacent normal tissue of breast and bladder cancer. *Eur. J. Cancer*, **37**, 1372–1380.
- 61. Longhese, M.P., Bonetti, D., Manfrini, N. and Clerici, M. (2010) Mechanisms and regulation of DNA end resection. *EMBO J.*, **29**, 2864–74.
- 62. Liu, T. and Huang, J. (2016) DNA End Resection: Facts and Mechanisms. *Genomics, Proteomics Bioinforma.*, **14**, 126–130.
- Nimonkar,A. V., Genschel,J., Kinoshita,E., Polaczek,P., Campbell,J.L., Wyman,C., Modrich,P. and Kowalczykowski,S.C. (2011) BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.*, 25, 350–362.
- 64. Symington,L.S. (2016) Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 10.3109/10409238.2016.1172552.
- 65. Stracker, T.H. and Petrini, J.H.J. (2011) The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 90–103.
- 66. Paull,T.T. and Gellert,M. (1998) The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell*, **1**, 969–979.
- 67. You,Z., Shi,L.Z., Zhu,Q., Wu,P., Zhang,Y.W., Basilio,A., Tonnu,N., Verma,I.M., Berns,M.W. and Hunter,T. (2009) CtIP Links DNA Double-Strand Break Sensing to Resection. *Mol. Cell*, **36**, 954–969.
- Sartori,A.A., Lukas,C., Coates,J., Mistrik,M., Fu,S., Bartek,J., Baer,R., Lukas,J. and Jackson,S.P. (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450, 509– 514.
- 69. Tomimatsu,N., Mukherjee,B., Deland,K., Kurimasa,A., Bolderson,E., Khanna,K.K. and Burma,S. (2012) Exo1 plays a major role in DNA end resection in humans and influences double-strand break repair and damage signaling decisions. *DNA Repair* (*Amst*)., **11**, 441–448.
- Zheng,L., Zhou,M., Guo,Z., Lu,H., Qian,L., Dai,H., Qiu,J., Yakubovskaya,E., Bogenhagen,D.F., Demple,B., *et al.* (2008) Human DNA2 Is a Mitochondrial Nuclease/Helicase for Efficient Processing of DNA Replication and Repair Intermediates. *Mol. Cell*, **32**, 325–336.
- Sturzenegger, A., Burdova, K., Kanagaraj, R., Levikova, M., Pinto, C., Cejka, P. and Janscak, P. (2014) DNA2 cooperates with the WRN and BLM RecQ helicases to mediate long-range DNA end resection in human cells. *J. Biol. Chem.*, 289, 27314– 27326.
- 72. Huen,M.S.Y., Sy,S.M.H. and Chen,J. (2010) BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 138–148.
- 73. Chen,L., Nievera,C.J., Lee,A.Y.-L. and Wu,X. (2008) Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.*, **283**, 7713–7720.
- 74. Schlegel,B.P., Jodelka,F.M. and Nunez,R. (2006) BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation. *Cancer Res.*, **66**, 5181–5189.
- 75. Cruz-García, A., López-Saavedra, A. and Huertas, P. (2014) BRCA1 accelerates CtIPediated DNA-end resection. *Cell Rep.*, **9**, 451–459.
- 76. Hoa,N.N., Kobayashi,J., Omura,M., Hirakawa,M., Yang,S.H., Komatsu,K., Paull,T.T., Takeda,S. and Sasanuma,H. (2015) BRCA1 and CtIP are both required to recruit

Dna2 at double-strand breaks in homologous recombination. *PLoS One*, 10.

- 77. Iftode, C., Daniely, Y. and Borowiec, J. a (1999) Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **34**, 141–180.
- Sandler,S.J., Satin,L.H., Samra,H.S. and Clark,A.J. (1996) RecA-like genes from three archaean species with putative protein products similar to Rad51 and Dmc1 proteins of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res.*, 24, 2125–2132.
- 79. Kawabata, M., Kawabata, T. and Nishibori, M. (2005) Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med. Okayama*, **59**, 1–9.
- Conway,A.B., Lynch,T.W., Zhang,Y., Fortin,G.S., Fung,C.W., Symington,L.S. and Rice,P. a (2004) Crystal structure of a Rad51 filament. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 791–796.
- Short,J.M., Liu,Y., Chen,S., Soni,N., Madhusudhan,M.S., Shivji,M.K.K. and Venkitaraman,A.R. (2016) High-resolution structure of the presynaptic RAD51 filament on single-stranded DNA by electron cryo-microscopy. *Nucleic Acids Res.*, 44, 9017–9030.
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B. and Heyer, W.-D. (2010) Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17, 1260–2.
- 83. Jensen, R.B., Carreira, A. and Kowalczykowski, S.C. (2010) Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, **467**, 678–683.
- 84. San Filippo, J., Sung, P. and Klein, H. (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 229–257.
- 85. Liu, J., Renault, L., Veaute, X., Fabre, F., Stahlberg, H. and Heyer, W.-D. (2011) Rad51 paralogues Rad55–Rad57 balance the antirecombinase Srs2 in Rad51 filament formation. *Nature*, **479**, 245–248.
- Veaute,X., Jeusset,J., Soustelle,C., Kowalczykowski,S.C., Le Cam,E. and Fabre,F. (2003) The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature*, **423**, 309–312.
- 87. Godin,S.K., Sullivan,M.R. and Bernstein,K.A. (2016) Novel insights into RAD51 activity and regulation during homologous recombination and DNA replication. *Biochem. Cell Biol.*, **94**, 407–418.
- 88. Baumann, P. and West, S.C. (1998) Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded break repair. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 247–251.
- 89. Bianco, P.R., Kowalczykowski, S.C. and Shibata, T. (2005) RecA protein. *Encycl. Life Sci.*, **32**, 1–9.
- Mazin,A. V., Bornarth,C.J., Solinger,J.A., Heyer,W.-D. and Kowalczykowski,S.C. (2000) Rad54 Protein Is Targeted to Pairing Loci by the Rad51 Nucleoprotein Filament. *Mol. Cell*, 6, 583–592.
- Mazin,A. V., Alexeev,A.A. and Kowalczykowski,S.C. (2003) A novel function of Rad54 protein: Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *J. Biol. Chem.*, 278, 14029–14036.
- 92. Solinger, J.A., Lutz, G., Sugiyama, T., Kowalczykowski, S.C. and Heyer, W.-D. (2001) Rad54 protein stimulates heteroduplex DNA formation in the synaptic phase of DNA strand exchange via specific interactions with the presynaptic Rad51 nucleoprotein filament. J. Mol. Biol., 307, 1207–1221.
- 93. LeRoy,G., Carroll,R., Kyin,S., Seki,M. and Cole,M.D. (2005) Identification of RecQL1 as a Holliday junction processing enzyme in human cell lines. *Nucleic Acids Res.*, 33, 6251–6257.
- 94. Wyatt,H.D.M. and West,S.C. (2014) Holliday junction resolvases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**.

- 95. Rass,U., Compton,S.A., Matos,J., Singleton,M.R., Ip,S.C.Y., Blanco,M.G., Griffith,J.D. and West,S.C. (2010) Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes Dev.*, 24, 1559–1569.
- 96. McVey, M., Khodaverdian, V.Y., Meyer, D., Cerqueira, P.G. and Heyer, W.-D. (2016) Eukaryotic DNA Polymerases in Homologous Recombination. *Annu. Rev. Genet.*, 50, 393–421.
- 97. Dueva, R. and Iliakis, G. (2013) Alternative pathways of non-homologous end joining ( NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl. Cancer Res.*, **2**, 163–177.
- 98. Bennardo,N., Cheng,A., Huang,N. and Stark,J.M. (2008) Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet.*, **4**.
- 99. Lieber, M.R. (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. J. Biol. Chem., 283, 1–5.
- 100. Lohman,G.J.S., Tabor,S. and Nichols,N.M. (2011) DNA ligases. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 10.1002/0471142727.mb0314s94.
- 101. Mao,Z., Bozzella,M., Seluanov,A. and Gorbunova,V. (2008) DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, **7**, 2902–6.
- 102. Critchlow, S.E. and Jackson, S.P. (1998) DNA end-joining: From yeast to man. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 394–398.
- 103. Jeggo, P. and Lavin, M.F. (2009) Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? *Int. J. Radiat. Biol.*, **85**, 1061–1081.
- 104. Liu,X., Shao,Z., Jiang,W., Lee,B.J. and Zha,S. (2017) PAXX promotes KU accumulation at DNA breaks and is essential for end-joining in XLF-deficient mice. *Nat. Commun.*, **8**, 13816.
- 105. Siede, W., Friedl, A.A., Dianova, I., Eckardt-Schupp, F. and Friedberg, E.C. (1996) The Saccharomyces cerevisiae Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. *Genetics*, **142**, 91–102.
- 106. Dudášová,Z., Dudáš,A. and Chovanec,M. (2004) Non-homologous end-joining factors of Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 581–601.
- 107. Mahaney, B.L., Meek, K. and Lees-Miller, S.P. (2009) Repair of ionizing radiationinduced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem. J.*, 417, 639–650.
- 108. Takahashi,A., Kubo,M., Ma,H., Nakagawa,A., Yoshida,Y., Isono,M., Kanai,T., Ohno,T., Furusawa,Y., Funayama,T., *et al.* (2014) Nonhomologous End-Joining Repair Plays a More Important Role than Homologous Recombination Repair in Defining Radiosensitivity after Exposure to High-LET Radiation. *Radiat. Res.*, 182, 338–344.
- 109. Malu,S., Malshetty,V., Francis,D. and Cortes,P. (2012) Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunol Res*, **54**, 233–246.
- 110. Kotnis, A., Du, L., Liu, C., Popov, S.W. and Pan-Hammarström, Q. (2009) Nonhomologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **364**, 653–65.
- 111. Tasher, D. and Dalal, I. (2012) The genetic basis of severe combined immunodeficiency and its variants. *Appl. Clin. Genet.*, **5**, 67–80.
- 112. Chinn,I.K. and Shearer,W.T. (2015) Severe Combined Immunodeficiency Disorders. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, **35**, 671–694.
- 113. Lobachevsky, P., Woodbine, L., Hsiao, K.C., Choo, S., Fraser, C., Gray, P., Smith, J., Best, N., Munforte, L., Korneeva, E., *et al.* (2015) Evaluation of severe combined immunodeficiency and combined immunodeficiency pediatric patients on the basis of

cellular radiosensitivity. J. Mol. Diagnostics, 17, 560-575.

- 114. Woodbine, L., Gennery, A.R. and Jeggo, P.A. (2014) Reprint of 'The clinical impact of deficiency in DNA non-homologous end-joining'. *DNA Repair (Amst).*, **17**, 9–20.
- 115. de Villartay, J.-P. (2015) Congenital defects in V(D)J recombination. *Br. Med. Bull.*, **114**, 157–167.
- 116. Weller, G.R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L.M., Scanlan, E., Della, M., Devine, S.K., Day, J.P., Wilkinson, A., d'Adda di Fagagna, F., *et al.* (2002) Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science*, **297**, 1686–9.
- 117. Della, M., Palmbos, P.L., Tseng, H.-M., Tonkin, L.M., Daley, J.M., Topper, L.M., Pitcher, R.S., Tomkinson, A.E., Wilson, T.E. and Doherty, A.J. (2004) Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science*, **306**, 683–5.
- 118. Moeller, R., Stackebrandt, E., Reitz, G., Berger, T., Rettberg, P., Doherty, A.J., Horneck, G. and Nicholson, W.L. (2007) Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in Bacillus subtilis spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *J. Bacteriol.*, **189**, 3306–3311.
- 119. McGovern,S., Baconnais,S., Roblin,P., Nicolas,P., Drevet,P., Simonson,H., Pietrement,O., Charbonnier,J.B., Le Cam,E., Noirot,P., *et al.* (2016) C-terminal region of bacterial Ku controls DNA bridging, DNA threading and recruitment of DNA ligase D for double strand breaks repair. *Nucleic Acids Res.*, 44, 4785–4806.
- 120. Shuman, S. and Glickman, M.S. (2007) Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 852–861.
- 121. Bowater, R. and Doherty, A.J. (2006) Making ends meet: Repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet.*, **2**, 93–99.
- 122. MacNeill,S.A. (2005) Genome stability: A self-sufficient DNA repair machine. *Curr. Biol.*, **15**.
- 123. Doherty, A.J., Jackson, S.P. and Weller, G.R. (2001) Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins [2]. *FEBS Lett.*, **500**, 186–188.
- 124. Aravind,L. and Koonin,E. V. (2001) Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNAend-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res.*, **11**, 1365–1374.
- 125. Grundy,G.J., Moulding,H.A., Caldecott,K.W. and Rulten,S.L. (2014) One ring to bring them all-The role of Ku in mammalian non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst).*, **17**, 30–38.
- 126. de Vega, M. (2013) The minimal *Bacillus subtilis* nonhomologous end joining repair machinery. *PLoS One*, **8**, e64232.
- 127. Zhu,H. and Shuman,S. (2005) A primer-dependent polymerase function of Pseudomonas aeruginosa ATP-dependent DNA ligase (LigD). J. Biol. Chem., 280, 418–427.
- 128. Pitcher,R.S., Tonkin,L.M., Green,A.J. and Doherty,A.J. (2005) Domain structure of a NHEJ DNA repair ligase from Mycobacterium tuberculosis. J. Mol. Biol., 351, 531– 544.
- 129. Downs, J. a and Jackson, S.P. (2004) A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 367–378.
- 130. Williams,G.J., Hammel,M., Radhakrishnan,S.K., Ramsden,D., Lees-Miller,S.P. and Tainer,J.A. (2014) Structural insights into NHEJ: Building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA Repair (Amst).*, **17**, 110–120.
- 131. Matsuzaki,K., Shinohara,A. and Shinohara,M. (2008) Forkhead-associated domain of yeast Xrs2, a homolog of human Nbs1, promotes nonhomologous end joining through

interaction with a ligase IV partner protein, Lif1. Genetics, 179, 213-225.

- 132. Wilson, T.E. and Lieber, M.R. (1999) Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining. Evidence for a DNA polymerase β (POL4)-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23599–23609.
- 133. Iwasaki,D., Hayashihara,K., Shima,H., Higashide,M., Terasawa,M., Gasser,S.M. and Shinohara,M. (2016) The MRX Complex Ensures NHEJ Fidelity through Multiple Pathways Including Xrs2-FHA–Dependent Tel1 Activation. *PLoS Genet.*, **12**.
- 134. Davis, A.J., Chen, B.P.C. and Chen, D.J. (2014) DNA-PK: A dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair (Amst).*, **17**, 21–29.
- 135. Yoo,S. and Dynan,W.S. (1999) Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4679–86.
- 136. Dobbs, T.A., Tainer, J.A. and Lees-Miller, S.P. (2010) A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation. *DNA Repair (Amst).*, **9**, 1307–1314.
- 137. Jiang, W., Crowe, J.L., Liu, X., Nakajima, S., Wang, Y., Li, C., Lee, B.J., Dubois, R.L., Liu, C., Yu, X., *et al.* (2015) Differential phosphorylation of DNA-PKcs regulates the interplay between end-processing and end-ligation during nonhomologous endjoining. *Mol. Cell*, 58, 172–185.
- Pawelczak,K.S., Bennett,S.M. and Turchi,J.J. (2011) Coordination of DNA-PK activation and nuclease processing of DNA termini in NHEJ. *Antioxid. Redox Signal.*, 14, 2531–43.
- 139. Ma,Y., Pannicke,U., Schwarz,K. and Lieber,M.R. (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, **108**, 781–794.
- 140. Moshous, D., Callebaut, I., De Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., *et al.* (2001) Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, **105**, 177–186.
- 141. Povirk,L.F., Zhou,T., Zhou,R., Cowan,M.J. and Yannone,S.M. (2007) Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by artemis nuclease. *J. Biol. Chem.*, **282**, 3547–3558.
- 142. Ahel,I., Rass,U., El-Khamisy,S.F., Katyal,S., Clements,P.M., McKinnon,P.J., Caldecott,K.W. and West,S.C. (2006) The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*, **443**, 713–716.
- 143. Kanno,S., Kuzuoka,H., Sasao,S., Hong,Z., Lan,L., Nakajima,S. and Yasui,A. (2007) A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses. *EMBO J.*, 26, 2094–103.
- 144. Grundy,G.J., Rulten,S.L., Zeng,Z., Arribas-Bosacoma,R., Iles,N., Manley,K., Oliver,A., Caldecott,K.W., Ahel,I., Ahel,D., *et al.* (2012) APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes. *EMBO J.*, 32, 112–125.
- 145. Jilani,A., Ramotar,D., Slack,C., Ong,C., Yang,X.M., Scherer,S.W. and Lasko,D.D. (1999) Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. J. Biol. Chem., 274, 24176–24186.
- 146. von Kobbe, C., Thomä, N.H., Czyzewski, B.K., Pavletich, N.P. and Bohr, V. a (2003) Werner syndrome protein contains three structure-specific DNA binding domains. *J. Biol. Chem.*, **278**, 52997–53006.
- 147. Shen, J.C. and Loeb, L. a (2000) Werner syndrome exonuclease catalyzes structuredependent degradation of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 3260–3268.

- 148. Opresko, P.L., Laine, J.P., Brosh, R.M., Seidman, M.M. and Bohr, V.A. (2001) Coordinate Action of the Helicase and 3??? to 5??? Exonuclease of Werner Syndrome Protein. J. Biol. Chem., 276, 44677–44687.
- 149. Ramsden, D.A. and Asagoshi, K. (2012) DNA polymerases in nonhomologous end joining: Are there any benefits to standing out from the crowd? *Environ. Mol. Mutagen.*, 53, 741–751.
- 150. McElhinny,S.A.N., Havener,J.M., Garcia-Diaz,M., Juárez,R., Bebenek,K., Kee,B.L., Blanco,L., Kunkel,T.A. and Ramsden,D.A. (2005) A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol. Cell*, **19**, 357–366.
- 151. Lee, J.W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wang, Z. and Povirk, L.F. (2004) Implication of DNA Polymerase ?? in Alignment-based Gap Filling for Nonhomologous DNA End Joining in Human Nuclear Extracts. *J. Biol. Chem.*, 279, 805–811.
- 152. Ellenberger, T. and Tomkinson, A.E. (2008) Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 313–38.
- 153. Deshpande,R.A. and Wilson,T.E. (2007) Modes of interaction among yeast Nej1, Lif1 and Dnl4 proteins and comparison to human XLF, XRCC4 and Lig4. *DNA Repair* (*Amst*)., **6**, 1507–1516.
- 154. Chen,X. and Tomkinson,A.E. (2011) Yeast Nej1 is a key participant in the initial end binding and final ligation steps of nonhomologous end joining. *J. Biol. Chem.*, **286**, 4931–4940.
- 155. Ahnesorg,P., Smith,P. and Jackson,S.P. (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, **124**, 301– 313.
- 156. Wilson, T.E., Grawunder, U. and Lieber, M.R. (1997) Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature*, **388**, 495–8.
- 157. Boulton,S.J. and Jackson,S.P. (1996) Identification of a Saccharomyces cerevisiae Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4639–48.
- 158. Frit, P., Barboule, N., Yuan, Y., Gomez, D. and Calsou, P. (2014) Alternative endjoining pathway(s): Bricolage at DNA breaks. *DNA Repair (Amst).*, **17**, 81–97.
- 159. Yu,A.M. and McVey,M. (2010) Synthesis-dependent microhomology-mediated end joining accounts for multiple types of repair junctions. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5706–5717.
- 160. McVey,M. and Lee,S.E. (2008) MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.*, **24**, 529–538.
- 161. Alt,F.W., Zhang,Y., Meng,F.L., Guo,C. and Schwer,B. (2013) Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell*, 152, 417–429.
- Aniukwu, J., Glickman, M.S. and Shuman, S. (2008) The pathways and outcomes of mycobacterial NHEJ depend on the structure of the broken DNA ends. *Genes Dev.*, 22, 512–527.
- 163. Pontier, D.B. and Tijsterman, M. (2009) A Robust Network of Double-Strand Break Repair Pathways Governs Genome Integrity during C. elegans Development. *Curr. Biol.*, 19, 1384–1388.
- 164. Kabotyanski,E.B., Gomelsky,L., Han,J., Stamato,T.D. and Roth,D.B. (1998) Doublestrand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res.*, 26, 27– 31.
- 165. Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2007) Defects in

XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 20902–20907.

- 166. Boboila,C., Yan,C., Wesemann,D.R., Jankovic,M., Wang,J.H., Manis,J., Nussenzweig,A., Nussenzweig,M. and Alt,F.W. (2013) Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4. *J. Exp. Med.*, **207**, 417–27.
- 167. Weinstock, D.M. and Jasin, M. (2006) Alternative pathways for the repair of RAGinduced DNA breaks. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 131–9.
- 168. 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.
- 169. Huambachano,O., Herrera,F., Rancourt,A. and Satoh,M.S. (2011) Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity. *J. Biol. Chem.*, **286**, 7149–7160.
- 170. 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.
- 171. Cheng,Q., Barboule,N., Frit,P., Gomez,D., Bombarde,O., Couderc,B., Ren,G.S., Salles,B. and Calsou,P. (2011) Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9605–9619.
- 172. Li,M. and Yu,X. (2015) The Role of Poly(ADP-ribosyl)ation in DNA Damage Response and Cancer Chemotherapy. *Oncogene*, **34**, 3349–3356.
- 173. Audebert, M., Salles, B. and Calsou, P. (2004) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.*, **279**, 55117–55126.
- 174. Audebert, M., Salles, B., Weinfeld, M. and Calsou, P. (2006) Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. *J. Mol. Biol.*, **356**, 257–265.
- 175. Audebert, M., Salles, B. and Calsou, P. (2008) Effect of double-strand break DNA sequence on the PARP-1 NHEJ pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 982–988.
- 176. Mansour, W.Y., Rhein, T. and Dahm-Daphi, J. (2010) The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 6065–6077.
- 177. Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 3563–71.
- 178. El-Khamisy,S.F., Masutani,M., Suzuki,H. and Caldecott,K.W. (2003) A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 5526–5533.
- 179. Leppard, J.B., Dong, Z., Mackey, Z.B. and Tomkinson, A.E. (2003) Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **23**, 5919–5927.
- 180. Truong,L.N., Li,Y., Shi,L.Z., Hwang,P.Y.-H., He,J., Wang,H., Razavian,N., Berns,M.W. and Wu,X. (2013) Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 7720–

5.

- 181. Zhang,Y. and Jasin,M. (2011) An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 80–4.
- 182. Zhuang, J., Jiang, G., Willers, H. and Xia, F. (2009) Exonuclease function of human Mre11 promotes deletional nonhomologous end joining. J. Biol. Chem., 284, 30565– 30573.
- 183. Kent,T., Chandramouly,G., McDevitt,S.M., Ozdemir,A.Y. and Pomerantz,R.T. (2015) Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase θ. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 22, 230–237.
- 184. Liang,L., Deng,L., Chen,Y., Li,G.C., Shao,C. and Tischfield,J. a (2005) Modulation of DNA end joining by nuclear proteins. *J. Biol. Chem.*, **280**, 31442–9.
- 185. Shamanna,R.A., Lu,H., de Freitas,J.K., Tian,J., Croteau,D.L. and Bohr,V.A. (2016) WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining. *Nat. Commun.*, **7**, 13785.
- 186. Wang,H., Rosidi,B., Perrault,R., Wang,M., Zhang,L., Windhofer,F. and Iliakis,G. (2005) DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res.*, **65**, 4020–4030.
- 187. Simsek, D., Brunet, E., Wong, S.Y.W., Katyal, S., Gao, Y., McKinnon, P.J., Lou, J., Zhang, L., Li, J., Rebar, E.J., *et al.* (2011) DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genet.*, **7**.
- Deriano, L. and Roth, D.B. (2013) Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu. Rev. Genet.*, 47, 433– 55.
- 189. Caldecott,K.W., Tucker,J.D., Stanker,L.H. and Thompson,L.H. (1995) Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4836–4843.
- 190. Caldecott,K.W., McKeown,C.K., Tucker,J.D., Ljungquist,S. and Thompson,L.H. (1994) An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 68–76.
- 191. Liang,L., Deng,L., Nguyen,S.C., Zhao,X., Maulion,C.D., Shao,C. and Tischfield,J.A. (2008) Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 3297–3310.
- 192. Zhu,C., Mills,K.D., Ferguson,D.O., Lee,C., Manis,J., Fleming,J., Gao,Y., Morton,C.C. and Alt,F.W. (2002) Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell*, **109**, 811–821.
- 193. Wang, J.H., Alt, F.W., Gostissa, M., Datta, A., Murphy, M., Alimzhanov, M.B., Coakley, K.M., Rajewsky, K., Manis, J.P. and Yan, C.T. (2008) Oncogenic transformation in the absence of Xrcc4 targets peripheral B cells that have undergone editing and switching. *J Exp Med*, **205**, 3079–3090.
- 194. Mimori, T., Akizuki, M., Yamagata, H., Inada, S., Yoshida, S. and Homma, M. (1981) Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J. Clin. Invest.*, **68**, 611–620.
- 195. Jin,S. and Weaver,D.T. (1997) Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimerization with Ku80 and DNA binding functions. *EMBO J.*, **16**, 6874–6885.
- 196. Francoeur, a M., Peebles, C.L., Gompper, P.T. and Tan, E.M. (1986) Identification of Ki (Ku, p70/p80) autoantigens and analysis of anti-Ki autoantibody reactivity. *J.*

Immunol., 136, 1648–1653.

- 197. Griffith,A.J., Blier,P.R., Mimori,T. and Hardin,J.A. (1992) Ku polypeptides synthesized in vitro assemble into complexes which recognize ends of double-stranded DNA. *J. Biol. Chem.*, **267**, 331–338.
- 198. Falzon, M., Fewell, J.W. and Kuff, E.L. (1993) EBP-80, a transcription factor closely resembling the human autoantigen Ku, recognizes single- to double-strand transitions in DNA. *J. Biol. Chem.*, **268**, 10546–10552.
- 199. Fewell,J.W. and Kuff,E.L. (1996) Intracellular redistribution of Ku immunoreactivity in response to cell-cell contact and growth modulating components in the medium. *J. Cell Sci.*, **109 ( Pt 7**, 1937–46.
- 200. Morio, T., Hanissian, S.H., Bacharier, L.B., Teraoka, H., Nonoyama, S., Seki, M., Kondo, J., Nakano, H., Lee, S.K., Geha, R.S., *et al.* (1999) Ku in the cytoplasm associates with CD40 in human B cells and translocates into the nucleus following incubation with IL-4 and anti-CD40 mAb. *Immunity*, **11**, 339–348.
- 201. Koike, M. (2002) Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. *J. Radiat. Res.*, **43**, 223–236.
- 202. Fell,V.L. and Schild-Poulter,C. (2015) The Ku heterodimer: Function in DNA repair and beyond. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **763**, 15–29.
- 203. Mari,P.-O., Florea,B.I., Persengiev,S.P., Verkaik,N.S., Brü Ggenwirth,H.T., Modesti,M., Giglia-Mari,G., Bezstarosti,K., Demmers,J.A.A., Luider,T.M., *et al.* (2006) Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *PNAS*, **103**, 18597–18602.
- 204. Kim,J.S., Krasieva,T.B., Kurumizaka,H., Chen,D.J., Taylor,A.M.R. and Yokomori,K. (2005) Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, **170**, 341–347.
- 205. Roberts, S.A. and Ramsden, D.A. (2007) Loading of the nonhomologous end joining factor, Ku, on protein-occluded DNA ends. J. Biol. Chem., **282**, 10605–10613.
- 206. Blier, P.R., Griffith, A.J., Craft, J. and Hardin, A. (1993) Binding of Ku Protein to DNA. *J. Biol. Chem.*, **268**, 7594–7601.
- 207. Mimori, T. and Hardin, J.A. (1986) Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. J. Biol. Chem., **261**, 10375–10379.
- 208. de Vries, E., van Driel, W., Bergsma, W.G., Arnberg, A.C. and van der Vliet, P.C. (1989) HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. *J. Mol. Biol.*, **208**, 65–78.
- 209. Zhang, W.W. and Yaneva, M. (1992) On the mechanisms of ku protein binding to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 574–579.
- 210. Paillard, S. and Strauss, F. (1991) Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5619–5624.
- 211. Tuteja, R. and Tuteja, N. (2000) Ku Autoantigen: A Multifunctional DNA-Binding Protein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 1–33.
- 212. Kosova,A.A., Khodyreva,S.N. and Lavrik,O.I. (2015) Ku80 interaction with apurinic/apyrimidinic sites depends on the structure of DNA ends. *Biopolym. Cell*, **30**, 42–46.
- 213. Yaneva, M., Kowalewski, T. and Lieber, M.R. (1997) Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: Biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.*, **16**, 5098–5112.
- 214. Sun,J., Lee,K.J., Davis,A.J. and Chen,D.J. (2012) Human Ku70/80 protein blocks exonuclease 1-mediated DNA resection in the presence of human Mre11 or Mre11/Rad50 protein complex. J. Biol. Chem., 287, 4936–4945.
- 215. Zierhut, C. and Diffley, J.F.X. (2008) Break dosage, cell cycle stage and DNA

replication influence DNA double strand break response. EMBO J., 27, 1875–1885.

- 216. Clerici,M., Mantiero,D., Guerini,I., Lucchini,G. and Longhese,M.P. (2008) The Yku70-Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle. *EMBO Rep.*, **9**, 810–818.
- 217. Uematsu,N., Weterings,E., Yano,K.I., Morotomi-Yano,K., Jakob,B., Taucher-Scholz,G., Mari,P.O., Van Gent,D.C., Chen,B.P.C. and Chen,D.J. (2007) Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. J. Cell Biol., 177, 219–229.
- 218. Gottlieb, T.M., Jackson, S.P., Allaway, G.P., Vivino, A.A., Kohn, L.D., Notkins, A.L., Prabhakar, B.S., Anderson, C.W., Lees-Miller, S.P., Carter, T., *et al.* (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, **72**, 131–42.
- 219. Han,Z., Johnston,C., Reeves,W.H., Carter,T., Wyche,J.H. and Hendrickson,E.A. (1996) Characterization of a Ku86 variant protein that results in altered DNA binding and diminished DNA-dependent protein kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 271, 14098– 14104.
- 220. Muller, C. and Salles, B. (1997) Regulation of DNA-dependent protein kinase activity in leukemic cells. *Oncogene*, **15**, 2343–8.
- 221. Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E. and Jeggo, P.A. (1999) The C Terminus of Ku80 Activates the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3267–3277.
- 222. Shirodkar, P., Fenton, A.L., Meng, L. and Koch, C.A. (2013) Identification and functional characterization of a ku-binding motif in aprataxin polynucleotide kinase/phosphatase-like factor (APLF). *J. Biol. Chem.*, **288**, 19604–19613.
- 223. Karmakar, P., Snowden, C.M., Ramsden, D.A. and Bohr, V.A. (2002) Ku heterodimer binds to both ends of the Werner protein and functional interaction occurs at the Werner N-terminus. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3583–91.
- 224. Grundy,G.J., Rulten,S.L., Arribas-Bosacoma,R., Davidson,K., Kozik,Z., Oliver,A.W., Pearl,L.H. and Caldecott,K.W. (2016) The Ku-binding motif is a conserved module for recruitment and stimulation of non-homologous end-joining proteins. *Nat. Commun.*, 7, 11242.
- 225. Macrae, C.J., McCulloch, R.D., Ylanko, J., Durocher, D. and Koch, C.A. (2008) APLF (C2orf13) facilitates nonhomologous end-joining and undergoes ATM-dependent hyperphosphorylation following ionizing radiation. *DNA Repair (Amst).*, 7, 292–302.
- 226. Tadi,S.K., Tellier-Lebègue,C., Nemoz,C., Drevet,P., Audebert,S., Roy,S., Meek,K., Charbonnier,J.B. and Modesti,M. (2016) PAXX Is an Accessory c-NHEJ Factor that Associates with Ku70 and Has Overlapping Functions with XLF. *Cell Rep.*, **17**, 541– 555.
- 227. Yano,K., Morotomi-Yano,K., Wang,S.-Y., Uematsu,N., Lee,K.-J., Asaithamby,A., Weterings,E. and Chen,D.J. (2008) Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. *EMBO Rep.*, **9**, 91–6.
- 228. Yano,K.I., Morotomi-Yano,K., Lee,K.J. and Chen,D.J. (2011) Functional significance of the interaction with Ku in DNA double-strand break recognition of XLF. *FEBS Lett.*, **585**, 841–846.
- 229. Costantini,S., Woodbine,L., Andreoli,L., Jeggo,P.A. and Vindigni,A. (2007) Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair (Amst).*, **6**, 712–722.
- 230. Hsu,H.L., Yannone,S.M. and Chen,D.J. (2002) Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA Repair (Amst).*, **1**, 225–235.
- 231. Nick McElhinny, S.A., Snowden, C.M., McCarville, J. and Ramsden, D.A. (2000) Ku

recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. Mol. Cell. Biol., 20, 2996–3003.

- 232. Modesti, M., Hesse, J.E. and Gellert, M. (1999) DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity. *EMBO J.*, **18**, 2008–2018.
- 233. Lu,H., Pannicke,U., Schwarz,K. and Lieber,M.R. (2007) Length-dependent binding of human XLF to DNA and stimulation of XRCC4·DNA ligase IV activity. *J. Biol. Chem.*, **282**, 11155–11162.
- 234. Jones, J.M., Gellert, M. and Yang, W. (2001) A Ku bridge over broken DNA. *Structure*, **9**, 881–884.
- 235. Feng,L. and Chen,J. (2012) The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 201–6.
- 236. Ismail,I.H., Gagné,J.-P., Genois,M.-M., Strickfaden,H., McDonald,D., Xu,Z., Poirier,G.G., Masson,J.-Y. and Hendzel,M.J. (2015) The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice. *Nat. Cell Biol.*, 17, 1446–57.
- 237. Postow, L. (2011) Destroying the ring: Freeing DNA from Ku with ubiquitin. *FEBS Lett.*, **585**, 2876–2882.
- 238. Ting,N.S.Y., Yu,Y., Pohorelic,B., Lees-Miller,S.P. and Beattie,T.L. (2005) Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2090–2098.
- 239. Stellwagen, A.E., Haimberger, Z.W., Veatch, J.R. and Gottschling, D.E. (2003) Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev.*, **17**, 2384–2395.
- 240. Hsu,H.L., Gilley,D., Blackburn,E.H. and Chen,D.J. (1999) Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 12454–8.
- 241. Bianchi, A. and De Lange, T. (1999) Ku binds telomeric DNA in vitro. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21223–21227.
- 242. Song,K., Jung,D., Jung,Y., Lee,S.G. and Lee,I. (2000) Interaction of human Ku70 with TRF2. In *FEBS Letters*.Vol. 481, pp. 81–85.
- 243. Hsu,H.L., Gilley,D., Galande,S.A., Prakash Hande,M., Allen,B., Kim,S.H., Li,G.C., Campisi,J., Kohwi-Shigematsu,T. and Chen,D.J. (2000) Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev.*, **14**, 2807–2812.
- 244. Jaco, I., Muñoz, P. and Blasco, M.A. (2004) Role of human Ku86 in telomere length maintenance and telomere capping. *Cancer Res.*, **64**, 7271–7278.
- 245. Myung,K., Ghosh,G., Fattah,F.J., Li,G., Kim,H., Dutia,A., Pak,E., Smith,S. and Hendrickson,E.A. (2004) Regulation of telomere length and suppression of genomic instability in human somatic cells by Ku86. *Mol Cell Biol*, **24**, 5050–5059.
- 246. Camara-Clayette, V., Thomas, D., Rahuel, C., Barbey, R., Cartron, J.P. and Bertrand, O. (1999) The repressor which binds the -75 GATA motif of the GPB promoter contains Ku70 as the DNA binding subunit. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1656–1663.
- 247. Giffin,W., Torrance,H., Rodda,D.J., Préfontaine,G.G., Pope,L. and Hache,R.J. (1996) Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription. *Nature*, **380**, 265–8.
- 248. Jeanson,L. and Mouscadet,J.F. (2002) Ku represses the HIV-1 transcription. Identification of a putative Ku binding site homologous to the mouse mammary tumor virus NRE1 sequence in the HIV-1 long terminal repeat. J. Biol. Chem., 277, 4918– 4924.
- 249. Maldonado, E., Shiekhattar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C.W., Linn, S. and Reinberg, D. (1996) A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature*, **381**, 86–9.

- 250. Mo,X. and Dynan,W.S. (2002) Subnuclear localization of Ku protein: functional association with RNA polymerase II elongation sites. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 8088–99.
- 251. Becker, A.K.A., Mikolajek, H., Paulsson, M., Wagener, R. and Werner, J.M. (2014) A structure of a collagen VI VWA domain displays n and c termini at opposite sides of the protein. *Structure*, **22**, 199–208.
- 252. Whittaker,C. a and Hynes,R.O. (2002) Distribution and Evolution of von Willebrand / Integrin A Domains : Widely Dispersed Domains with Roles in Cell Adhesion and Elsewhere □. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 3369–3387.
- 253. Hu,S., Pluth,J.M. and Cucinotta,F.A. (2012) Putative binding modes of Ku70-SAP domain with double strand DNA: A molecular modeling study. *J. Mol. Model.*, **18**, 2163–2174.
- 254. Zhang,Z., Zhu,L., Lin,D., Chen,F., Chen,D.J. and Chen,Y. (2001) The Threedimensional Structure of the C-terminal DNA-binding Domain of Human Ku70. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38231–38236.
- 255. Walker, J.R., Corpina, R.A. and Goldberg, J. (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, **412**, 607–14.
- 256. Ochi, T., Sibanda, B.L., Wu, Q., Chirgadze, D.Y., Bolanos-Garcia, V.M. and Blundell, T.L. (2010) Structural biology of DNA repair: spatial organisation of the multicomponent complexes of nonhomologous end joining. *J. Nucleic Acids*, **2010**, 1– 28.
- 257. Rivera-Calzada,A., Spagnolo,L., Pearl,L.H., Llorca,O., Aravind,L., Koonin,E., Chacon,P., Wriggers,W., Doherty,A., Jackson,S., *et al.* (2007) Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. *EMBO Rep.*, **8**, 56–62.
- 258. Lehman, J.A., Hoelz, D.J. and Turchi, J.J. (2008) DNA-dependent conformational changes in the Ku heterodimer. *Biochemistry*, **47**, 4359–4368.
- 259. Sharif,H., Li,Y., Dong,Y., Dong,L., Wang,W.L., Mao,Y. and Wu,H. (2017) Cryo-EM structure of the DNA-PK holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **114**, 7367–7372.
- 260. Hartley, K.O., Gell, D., Smith, G.C., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M.A., Admon, A., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W. and Jackson, S.P. (1995) DNAdependent protein kinase catalytic subunit: A relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell*, **82**, 849–856.
- 261. Abraham, R.T. (2004) PI 3-kinase related kinases: 'Big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst).*, **3**, 883–887.
- 262. Bogue, M.A., Jhappan, C. and Roth, D.B. (1998) Analysis of variable (diversity) joining recombination in DNAdependent protein kinase (DNA-PK)-deficient mice reveals DNA-PK-independent pathways for both signal and coding joint formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15559–15564.
- 263. Taccioli,G.E., Amatucci,A.G., Beamish,H.J., Gell,D., Xiang,X.H., Torres Arzayus,M.I., Priestley,A., Jackson,S.P., Rothstein,A.M., Jeggo,P.A., *et al.* (1998) Targeted disruption of the catalytic subunit of the DNA-PK gene in mice confers severe combined immunodeficiency and radiosensitivity. *Immunity*, **9**, 355–366.
- 264. Beamish,H.J., Jessberger,R., Riballo,E., Priestley,A., Blunt,T., Kysela,B. and Jeggo,P.A. (2000) The C-terminal conserved domain of DNA-PKcs, missing in the SCID mouse, is required for kinase activity. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1506–13.
- 265. Jung, D. and Alt, F.W. (2004) Unraveling V(D)J Recombination: Insights into Gene Regulation. *Cell*, **116**, 299–311.
- 266. Van Der Burg, M., IJspeert, H., Verkaik, N.S., Turul, T., Wiegant, W.W., Morotomi-Yano, K., Mari, P.O., Tezcan, I., Chen, D.J., Zdzienicka, M.Z., *et al.* (2009) A DNA-

PKcs mutation in a radiosensitive T-B- SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. J. Clin. Invest., **119**, 91–98.

- 267. Anderson, C.W. and Lees-Miller, S.P. (1992) The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **2**, 283–314.
- 268. Chan,D.W., Ye,R., Veillette,C.J. and Lees-Miller,S.P. (1999) DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. *Biochemistry*, **38**, 1819–1828.
- 269. Neal,J.A., Sugiman-Marangos,S., VanderVere-Carozza,P., Wagner,M., Turchi,J., Lees-Miller,S.P., Junop,M.S. and Meek,K. (2014) Unraveling the complexities of DNA-dependent protein kinase autophosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 2162–75.
- 270. Douglas, P., Sapkota, G.P., Morrice, N., Yu, Y., Goodarzi, A. a, Merkle, D., Meek, K., Alessi, D.R. and Lees-Miller, S.P. (2002) Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Biochem. J.*, **368**, 243–251.
- 271. Yu,Y., Wang,W., Ding,Q., Ye,R., Chen,D., Merkle,D., Schriemer,D., Meek,K. and Lees-Miller,S.P. (2003) DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst).*, **2**, 1239–1252.
- 272. Lee,K.J., Jovanovic,M., Udayakumar,D., Bladen,C.L. and Dynan,W.S. (2004) Identification of DNA-PKcs phosphorylation sites in XRCC4 and effects of mutations at these sites on DNA end joining in a cell-free system. *DNA Repair (Amst).*, **3**, 267– 276.
- 273. Leber, R., Wise, T.W., Mizuta, R. and Meek, K. (1998) The XRCC4 Gene Product Is a Target for and Interacts with the DNA-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1794–1801.
- 274. Critchlow,S.E., Bowater,R.P. and Jackson,S.P. (1997) Mammalian DNA doublestrand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr. Biol.*, **7**, 588– 598.
- 275. Yu,Y., Mahaney,B.L., Yano,K.I., Ye,R., Fang,S., Douglas,P., Chen,D.J. and Lees-Miller,S.P. (2008) DNA-PK and ATM phosphorylation sites in XLF/Cernunnos are not required for repair of DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst).*, 7, 1680– 1692.
- 276. Wang, Y.G., Nnakwe, C., Lane, W.S., Modesti, M. and Frank, K.M. (2004) Phosphorylation and regulation of DNA ligase IV stability by DNA-dependent protein kinase. J. Biol. Chem., 279, 37282–37290.
- 277. Yannone,S.M., Roy,S., Chan,D.W., Murphy,M.B., Huang,S., Campisi,J. and Chen,D.J. (2001) Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNAdependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38242–8.
- 278. Meek,K., Douglas,P., Cui,X., Ding,Q. and Lees-Miller,S.P. (2007) trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 3881–90.
- 279. Block, W.D., Yu, Y., Merkle, D., Gifford, J.L., Ding, Q., Meek, K. and Lees-Miller, S.P. (2004) Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4351– 4357.
- 280. Chan,D.W. and Lees-Miller,S.P. (1996) The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8936–8941.
- 281. Goodarzi,A.A., Yu,Y., Riballo,E., Douglas,P., Walker,S.A., Ye,R., Härer,C., Marchetti,C., Morrice,N., Jeggo,P.A., *et al.* (2006) DNA-PK autophosphorylation

facilitates Artemis endonuclease activity. EMBO J., 25, 3880-9.

- 282. Gu,J., Li,S., Zhang,X., Wang,L.C., Niewolik,D., Schwarz,K., Legerski,R.J., Zandi,E. and Lieber,M.R. (2010) DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease activity of Artemis. *DNA Repair (Amst).*, **9**, 429–437.
- 283. Matsumoto, Y., Suzuki, N., Namba, N., Umeda, N., Ma, X.J., Morita, A., Tomita, M., Enomoto, A., Serizawa, S., Hirano, K., *et al.* (2000) Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS Lett.*, **478**, 67–71.
- 284. Drouet, J., Delteil, C., Lefrançois, J., Concannon, P., Salles, B. and Calsou, P. (2005) DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.*, **280**, 7060–9.
- 285. Sharma,M.K., Imamichi,S., Fukuchi,M., Samarth,R.M., Tomita,M. and Matsumoto,Y. (2016) In cellulo phosphorylation of XRCC4 Ser320 by DNA-PK induced by DNA damage. J. Radiat. Res., 57, 115–120.
- 286. DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D. and Chu, G. (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.*, **21**, 3192–3200.
- 287. Chang,H.H.Y., Watanabe,G., Gerodimos,C.A., Ochi,T., Blundell,T.L., Jackson,S.P. and Lieber,M.R. (2016) Different DNA end configurations dictate which NHEJ components are most important for joining efficiency. *J. Biol. Chem.*, **291**, 24377–24389.
- 288. Williams,D.R., Lee,K., Shi,J., Chen,D.J. and Phoebe,L. (2009) Cryoelectron Microscopy Structure of the DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit (DNA-PKcs) at Subnanometer Resolution Reveals α-Helices and Insight into DNA Binding. *Mol. Physiol.*, **16**, 468–477.
- 289. Chiu,C.Y., Cary,R.B., Chen,D.J., Peterson,S.R. and Stewart,P.L. (1998) Cryo-EM imaging of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *J. Mol. Biol.*, **284**, 1075–81.
- 290. Williams, D.R., Lee, K.J., Shi, J., Chen, D.J. and Stewart, P.L. (2008) Cryo-EM Structure of the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit at Subnanometer Resolution Reveals ?? Helices and Insight into DNA Binding. *Structure*, **16**, 468–477.
- 291. Jin,S., Kharbanda,S., Mayer,B., Kufe,D. and Weaver,D.T. (1997) Binding of Ku and c-Abl at the kinase homology region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24763–24766.
- 292. Sibanda,B.L., Chirgadze,D.Y. and Blundell,T.L. (2010) Crystal Structure of DNA-PKcs Reveals a Large Open-Ring Cradle Comprised of HEAT Repeats. *Nature*, **463**, 118–121.
- 293. Malu,S., Ioannes,P. De, Kozlov,M., Greene,M., Francis,D., Hanna,M., Pena,J., Escalante,C.R., Kurosawa,A., Erdjument-Bromage,H., *et al.* (2012) Artemis Cterminal region facilitates V(D)J recombination through its interactions with DNA Ligase IV and DNA-PKcs. *J. Exp. Med*, **209**, 955–963.
- 294. Soubeyrand, S., Pope, L., De Chasseval, R., Gosselin, D., Dong, F., de Villartay, J.P. and Haché, R.J.G. (2006) Artemis Phosphorylated by DNA-dependent Protein Kinase Associates Preferentially with Discrete Regions of Chromatin. *J. Mol. Biol.*, **358**, 1200–1211.
- 295. Drouet, J., Frit, P., Delteil, C., De Villartay, J.P., Salles, B. and Calsou, P. (2006) Interplay between Ku, artemis, and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at DNA ends. *J. Biol. Chem.*, **281**, 27784–27793.
- 296. Riballo,E., Kühne,M., Rief,N., Doherty,A., Smith,G.C.M., Recio,M.J., Reis,C., Dahm,K., Fricke,A., Krempler,A., *et al.* (2004) A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to ??-H2AX foci. *Mol. Cell*, **16**, 715–724.

- 297. Moshous, D., Pannetier, C., De Chasseval, R., Le Deist, F., Cavazzana-Calvo, M., Romana, S., Macintyre, E., Canioni, D., Brousse, N., Fischer, A., *et al.* (2003) Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *J. Clin. Invest.*, **111**, 381–387.
- 298. de Villartay, J.P., Shimazaki, N., Charbonnier, J.B., Fischer, A., Mornon, J.P., Lieber, M.R. and Callebaut, I. (2009) A histidine in the β-CASP domain of Artemis is critical for its full in vitro and in vivo functions. *DNA Repair (Amst).*, **8**, 202–208.
- 299. Mehrotra, P.V., Ahel, D., Ryan, D.P., Weston, R., Wiechens, N., Kraehenbuehl, R., Owen-Hughes, T. and Ahel, I. (2011) DNA repair factor APLF Is a histone chaperone. *Mol. Cell*, **41**, 46–55.
- 300. Multani, A.S. and Chang, S. (2007) WRN at telomeres: implications for aging and cancer. J. Cell Sci., **120**, 713–21.
- 301. Brosh,R.M. and Bohr,V.A. (2007) Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7527–7544.
- 302. Chen,L., Huang,S., Lee,L., Davalos,A., Schiestl,R.H., Campisi,J. and Oshima,J. (2003) WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair. *Aging Cell*, 2, 191–199.
- 303. Cooper,M.P., Machwe,A., Orren,D.K., Brosh,R.M., Ramsden,D. and Bohr,V.A. (2000) Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev.*, 14, 907–912.
- 304. Kusumoto, R., Dawut, L., Marchetti, C., Jae, W.L., Vindigni, A., Ramsden, D. and Bohr, V.A. (2008) Werner protein cooperates with the XRCC4-DNA ligase IV complex in end-processing. *Biochemistry*, 47, 7548–7556.
- 305. Karmakar, P., Piotrowski, J., Brosh, R.M., Sommers, J. a, Miller, S.P.L., Cheng, W.-H., Snowden, C.M., Ramsden, D. a and Bohr, V. a (2002) Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase in vivo and in vitro, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation. J. Biol. Chem., 277, 18291–302.
- 306. Coquelle,N., Havali-Shahriari,Z., Bernstein,N., Green,R. and Glovera,J.N.M. (2011) Structural basis for the phosphatase activity of polynucleotide kinase/phosphatase on singleand double-stranded DNA substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 21022–21027.
- 307. Weinfeld,M., Mani,R.S., Abdou,I., Aceytuno,R.D. and Glover,J.N.M. (2011) Tidying up loose ends: The role of polynucleotide kinase/phosphatase in DNA strand break repair. *Trends Biochem. Sci.*, **36**, 262–271.
- 308. Rasouli-Nia, A., Karimi-Busheri, F. and Weinfeld, M. (2004) Stable down-regulation of human polynucleotide kinase enhances spontaneous mutation frequency and sensitizes cells to genotoxic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 6905–6910.
- 309. Karimi-Busheri,F., Rasouli-Nia,A., Allalunis-Turner,J. and Weinfeld,M. (2007) Human polynucleotide kinase participates in repair of DNA double-strand breaks by nonhomologous end joining but not homologous recombination. *Cancer Res.*, **67**, 6619–6625.
- 310. Chappell,C., Hanakahi,L.A., Karimi-Busheri,F., Weinfeld,M. and West,S.C. (2002) Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by nonhomologous end joining. *EMBO J*, 21, 2827–2832.
- 311. Koch,C.A., Agyei,R., Galicia,S., Metalnikov,P., O'Donnell,P., Starostine,A., Weinfeld,M. and Durocher,D. (2004) Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J.*, 23, 3874–85.
- 312. Sobol,R.W., Horton,J.K., Kühn,R., Gu,H., Singhal,R.K., Prasad,R., Rajewsky,K. and Wilson,S.H. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*, **379**, 183–6.

- 313. Romain, F., Barbosa, I., Gouge, J., Rougeon, F. and Delarue, M. (2009) Conferring a template-dependent polymerase activity to terminal deoxynucleotidyltransferase by mutations in the Loop1 region. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4642–4656.
- 314. Yamtich, J. and Sweasy, J.B. (2010) DNA polymerase Family X: Function, structure, and cellular roles. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*, **1804**, 1136–1150.
- 315. Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J.M., Blanco, L., Kunkel, T.A. and Pedersen, L.C. (2004) A structural solution for the DNA polymerase ??-dependent repair of DNA gaps with minimal homology. *Mol. Cell*, **13**, 561–572.
- 316. Moon,A.F., Garcia-Diaz,M., Bebenek,K., Davis,B.J., Zhong,X., Ramsden,D. a, Kunkel,T. a and Pedersen,L.C. (2007) Structural insight into the substrate specificity of DNA Polymerase mu. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 45–53.
- 317. Delarue, M., Boulé, J.B., Lescar, J., Expert-Bezançon, N., Jourdan, N., Sukumar, N., Rougeon, F. and Papanicolaou, C. (2002) Crystal structures of a template-independent DNA polymerase: Murine terminal deoxynucleotidyltransferase. *EMBO J.*, 21, 427– 439.
- 318. Mahajan,K.N., Nick McElhinny,S. a, Mitchell,B.S. and Ramsden,D.A. (2002) Association of DNA polymerase  $\mu$  (pol  $\mu$ ) with Ku and ligase IV: role for pol  $\mu$  in end-joining double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 5194–202.
- 319. Boubakour-Azzouz, I., Bertrand, P., Claes, A., Lopez, B.S. and Rougeon, F. (2012) Terminal deoxynucleotidyl transferase requires KU80 and XRCC4 to promote Naddition at non-V(D)J chromosomal breaks in non-lymphoid cells. *Nucleic Acids Res.*, 40, 8381–8391.
- 320. Fan,W. and Wu,X. (2004) DNA polymerase ?? can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 1328–1333.
- 321. Frank,K.M., Sekiguchi,J.M., Seidl,K.J., Swat,W., Rathbun,G. a, Cheng,H.L., Davidson,L., Kangaloo,L. and Alt,F.W. (1998) Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature*, **396**, 173–177.
- 322. Revy,P., Malivert,L. and de Villartay,J.-P. (2006) Cernunnos-XLF, a recently identified non-homologous end-joining factor required for the development of the immune system. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **6**, 416–20.
- 323. Gao, Y., Sun, Y., Frank, K.M., Dikkes, P., Fujiwara, Y., Seidl, K.J., Sekiguchi, J.A.M., Rathbun, G.A., Swat, W., Wang, J., *et al.* (1998) A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell*, **95**, 891–902.
- 324. Lehman, I.R. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science*, **186**, 790–7.
- 325. Robins, P. and Lindahl, T. (1996) DNA ligase IV from HeLa cell nuclei. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24257–24261.
- 326. Grawunder, U., Zimmer, D., Fugmann, S., Schwarz, K. and Lieber, M.R. (1998) DNA LIgase IV is Essential for V(D)J Recombination and DNA Double-Strand Break Repair in Human Precursor Lymphocytes. *Mol. Cell*, **2**, 477–484.
- 327. Tomkinson, A.E. and Mackey, Z.B. (1998) Structure and function of mammalian DNA ligases. *Mutat. Res.*, **407**, 1–9.
- 328. Barnes, D.E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A. and Lindahl, T. (1998) Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr. Biol.*, **8**, 1395–1398.
- 329. Wei,Y.F., Robins,P., Carter,K., Caldecott,K., Pappin,D.J., Yu,G.L., Wang,R.P., Shell,B.K., Nash,R. a and Schär,P. (1995) Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3206–16.

- 330. Riballo,E., Critchlow,S.E., Teo,S.H., Doherty,A.J., Priestley,A., Broughton,B., Kysela,B., Beamish,H., Plowman,N., Arlett,C.F., *et al.* (1999) Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr. Biol.*, 9, 699– 702.
- 331. O'Driscoll,M., Cerosaletti,K.M., Girard,P.M., Dai,Y., Stumm,M., Kysela,B., Hirsch,B., Gennery,A., Palmer,S.E., Seidel,J., *et al.* (2001) DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell*, 8, 1175–1185.
- 332. O'Driscoll,M., Gennery,A.R., Seidel,J., Concannon,P. and Jeggo,P.A. (2004) An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair (Amst).*, **3**, 1227–1235.
- 333. Tomkinson, A.E., Vijayakumar, S., Pascal, J.M. and Ellenberger, T. (2006) DNA ligases: Structure, reaction mechanism, and function. *Chem. Rev.*, **106**, 687–699.
- 334. Grawunder, U., Zimmer, D. and Lieber, M.R. (1998) DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Curr. Biol.*, **8**, 873–879.
- 335. Wu,P.-Y., Frit,P., Meesala,S., Dauvillier,S., Modesti,M., Andres,S.N., Huang,Y., Sekiguchi,J., Calsou,P., Salles,B., *et al.* (2009) Structural and functional interaction between the human DNA repair proteins DNA ligase IV and XRCC4. *Mol. Cell. Biol.*, 29, 3163–72.
- 336. De Ioannes, P., Malu, S., Cortes, P. and Aggarwal, A.K. (2012) Structural Basis of DNA Ligase IV-Artemis Interaction in Nonhomologous End-Joining. *Cell Rep.*, 2, 1505– 1512.
- 337. Ochi,T., Gu,X. and Blundell,T.L. (2013) Structure of the catalytic region of DNA ligase IV in complex with an artemis fragment sheds light on double-strand break repair. *Structure*, **21**, 672–679.
- 338. Mizuta, R., Cheng, H.L., Gao, Y. and Alt, F.W. (1997) Molecular genetic characterization of XRCC4 function. *Int. Immunol.*, **9**, 1607–1613.
- 339. Li,J., Yu,Y., Suo,F., Sun,L.-L., Zhao,D. and Du,L.-L. (2014) Genome-wide Screens for Sensitivity to Ionizing Radiation Identify the Fission Yeast Nonhomologous End Joining Factor Xrc4. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, **4**, 1297–1306.
- 340. Herrmann,G., Lindahl,T. and Schär,P. (1998) Saccharomyces cerevisiae LIF1: A function involved in DNA double-strand break repair related to mammalian XRCC4. *EMBO J.*, **17**, 4188–4198.
- 341. Li,Z., Otevrel,T., Gao,Y., Cheng,H.L., Seed,B., Stamato,T.D., Taccioli,G.E. and Alt,F.W. (1995) The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell*, **83**, 1079–1089.
- 342. Bryans, M., Valenzano, M.C. and Stamato, T.D. (1999) Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: Evidence for stabilization by XRCC4. *Mutat. Res. DNA Repair*, **433**, 53–58.
- 343. Mani,R.S., Yu,Y., Fang,S., Lu,M., Fanta,M., Zolner,A.E., Tahbaz,N., Ramsden,D.A., Litchfield,D.W., Lees-Miller,S.P., *et al.* (2010) Dual modes of interaction between XRCC4 and polynucleotide kinase/phosphatase: Implications for nonhomologous end joining. *J. Biol. Chem.*, 285, 37619–37629.
- 344. Gao, Y., Ferguson, D.O., Xie, W., Manis, J.P., Sekiguchi, J., Frank, K.M., Chaudhuri, J., Horner, J., DePinho, R. a and Alt, F.W. (2000) Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature*, **404**, 897–900.
- 345. Murray, J.E., Van Der Burg, M., Ijspeert, H., Carroll, P., Wu, Q., Ochi, T., Leitch, A., Miller, E.S., Kysela, B., Jawad, A., *et al.* (2015) Mutations in the NHEJ component XRCC4 cause primordial dwarfism. *Am. J. Hum. Genet.*, **96**, 412–424.

- 346. De Bruin,C., Mericq,V., Andrew,S.F., Van Duyvenvoorde,H.A., Verkaik,N.S., Losekoot,M., Porollo,A., Garcia,H., Kuang,Y., Hanson,D., *et al.* (2015) An XRCC4 splice mutation associated with severe short stature, gonadal failure, and early-onset metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **100**, E789–E798.
- 347. Bee,L., Nasca,A., Zanolini,A., Cendron,F., d'Adamo,P., Costa,R., Lamperti,C., Celotti,L., Ghezzi,D. and Zeviani,M. (2015) A nonsense mutation of human XRCC4 is associated with adult-onset progressive encephalocardiomyopathy. *EMBO Mol. Med.*, 7, 918–929.
- 348. Allen-Brady,K., Cannon-Albright,L., Neuhausen,S. and Camp,N. (2006) A Role for XRCC4 in Age at Diagnosis and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **15**, 1306–1310.
- 349. Shao, N., Jiang, W.Y., Qiao, D., Zhang, S.G., Wu, Y., Zhang, X.X., Hua, L.X., Ding, Y. and Feng, N.H. (2012) An updated meta-analysis of XRCC4 polymorphisms and cancer risk based on 31 case-control studies. *Cancer Biomarkers*, **12**, 37–47.
- 350. Becherel,O.J., Jakob,B., Cherry,A.L., Gueven,N., Fusser,M., Kijas,A.W., Peng,C., Katyal,S., McKinnon,P.J., Chen,J., *et al.* (2009) CK2 phosphorylation-dependent interaction between aprataxin and MDC1 in the DNA damage response. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1489–1503.
- 351. Iles, N., Rulten, S., El-Khamisy, S. and Caldecott, K. (2007) APLF (C2orf13) is a novel human protein involved in the cellular response to chromosomal DNA strand breaks. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 3793–3803.
- 352. Clements, P.M., Breslin, C., Deeks, E.D., Byrd, P.J., Ju, L., Bieganowski, P., Brenner, C., Moreira, M.C., Taylor, A.M.R. and Caldecott, K.W. (2004) The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4. *DNA Repair (Amst).*, **3**, 1493–1502.
- 353. KAMDAR,R.P. and MATSUMOTO,Y. (2010) Radiation-induced XRCC4 Association with Chromatin DNA Analyzed by Biochemical Fractionation. *J. Radiat. Res.*, **51**, 303–313.
- 354. Junop,M.S., Modesti,M., Guarné, a, Ghirlando,R., Gellert,M. and Yang,W. (2000) Crystal structure of the Xrcc4 DNA repair protein and implications for end joining. *EMBO J.*, **19**, 5962–5970.
- 355. Mahaney,B.L., Hammel,M., Meek,K., Tainer,J.A. and Lees-Miller,S.P. (2012) XRCC4 and XLF form long helical protein filaments suitable for DNA end protection and alignment to facilitate DNA double strand break repair. *Natl. Institutes Heal.*, 29, 997–1003.
- 356. Hammel, M., Yu, Y., Fang, S., Lees-Miller, S.P. and Tainer, J.A. (2010) XLF Regulates Filament Architecture of the XRCC4??Ligase IV Complex. *Structure*, **18**, 1431–1442.
- 357. Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M. and Lieber, M.R. (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, **388**, 492–5.
- 358. Sibanda,B.L., Critchlow,S.E., Begun,J., Pei,X.Y., Jackson,S.P., Blundell,T.L. and Pellegrini,L. (2001) Crystal structure of an Xrcc4–DNA ligase IV complex. *Nature*, **8**, 1015–1019.
- 359. Modesti, M., Junop, M.S., Ghirlando, R., van de Rakt, M., Gellert, M., Yang, W. and Kanaar, R. (2003) Tetramerization and DNA ligase IV interaction of the DNA double-strand break repair protein XRCC4 are mutually exclusive. *J Mol Biol*, **334**, 215–228.
- 360. Gu,J., Lu,H., Tippin,B., Shimazaki,N., Goodman,M.F. and Lieber,M.R. (2007) XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J.*, 26, 3506–3507.
- 361. Gu,J., Lu,H., Tsai,A.G., Schwarz,K. and Lieber,M.R. (2007) Single-stranded DNA

ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: Influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5755–5762.

- 362. Ma,Y., Lu,H., Tippin,B., Goodman,M.F., Shimazaki,N., Koiwai,O., Hsieh,C.L., Schwarz,K. and Lieber,M.R. (2004) A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol. Cell*, **16**, 701–713.
- 363. Gerodimos, C.A., Chang, H.H.Y., Watanabe, G. and Lieber, M.R. (2017) Effects of DNA end configuration on XRCC4-DNA ligase IV and its stimulation of Artemis activity. *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M117.798850.
- 364. Buck, D., Malivert, L., De Chasseval, R., Barraud, A., Fondan??che, M.C., Sanal, O., Plebani, A., St??phan, J.L., Hufnagel, M., Le Deist, F., *et al.* (2006) Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, **124**, 287–299.
- 365. Daley, J.M., Palmbos, P.L., Wu, D. and Wilson, T.E. (2005) Nonhomologous End Joining in Yeast. *Annu. Rev. Genet.*, **39**, 431–451.
- 366. Valencia, M., Bentele, M., Vaze, M.B., Herrmann, G., Kraus, E., Lee, S.E., Schär, P. and Haber, J.E. (2001) NEJ1 controls non-homologous end joining in Saccharomyces cerevisiae. *Nature*, **414**, 666–669.
- 367. Hentges, P., Ahnesorg, P., Pitcher, R.S., Bruce, C.K., Kysela, B., Green, A.J., Bianchi, J., Wilson, T.E., Jackson, S.P. and Doherty, A.J. (2006) Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. J. *Biol. Chem.*, 281, 37517–37526.
- 368. Buck, D., Moshous, D., de Chasseval, R., Ma, Y., le Deist, F., Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A., Casanova, J.L., Lieber, M.R. and de Villartay, J.P. (2006) Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase IV. *Eur. J. Immunol.*, 36, 224–235.
- 369. Zha,S., Alt,F.W., Cheng,H.-L., Brush,J.W. and Li,G. (2007) Defective DNA repair and increased genomic instability in Cernunnos-XLF-deficient murine ES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 4518–4523.
- 370. Li,G., Alt,F.W., Cheng,H.L., Brush,J.W., Goff,P.H., Murphy,M.M., Franco,S., Zhang,Y. and Zha,S. (2008) Lymphocyte-Specific Compensation for XLF/Cernunnos End-Joining Functions in V(D)J Recombination. *Mol. Cell*, **31**, 631–640.
- 371. Tsai,C.J., Kim,S. a and Chu,G. (2007) Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 7851–6.
- 372. Li,Y., Chirgadze,D.Y., Bolanos-Garcia,V.M., Sibanda,B.L., Davies,O.R., Ahnesorg,P., Jackson,S.P. and Blundell,T.L. (2008) Crystal structure of human XLF/Cernunnos reveals unexpected differences from XRCC4 with implications for NHEJ. *EMBO J.*, 27, 290–300.
- 373. Andres, S.N., Vergnes, A., Ristic, D., Wyman, C., Modesti, M. and Junop, M. (2012) A human XRCC4-XLF complex bridges DNA. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 1868–1878.
- 374. Hammel, M., Rey, M., Yu, Y., Mani, R.S., Classen, S., Liu, M., Pique, M.E., Fang, S., Mahaney, B.L., Weinfeld, M., *et al.* (2011) XRCC4 protein interactions with XRCC4like factor (XLF) create an extended grooved scaffold for DNA ligation and double strand break repair. *J. Biol. Chem.*, **286**, 32638–32650.
- 375. Andres, S.N., Modesti, M., Tsai, C.J., Chu, G. and Junop, M.S. (2007) Crystal Structure of Human XLF: A Twist in Nonhomologous DNA End-Joining. *Mol. Cell*, **28**, 1093–1101.
- 376. Malivert,L., Ropars,V., Nunez,M., Drevet,P., Miron,S., Faure,G., Guerois,R., Mornon,J.P., Revy,P., Charbonnier,J.B., *et al.* (2010) Delineation of the Xrcc4interacting region in the globular head domain of cernunnos/XLF. *J. Biol. Chem.*, **285**,

26475-26483.

- 377. Roy,S., Andres,S.N., Vergnes,A., Neal,J.A., Xu,Y., Yu,Y., Lees-Miller,S.P., Junop,M., Modesti,M. and Meek,K. (2012) XRCC4's interaction with XLF is required for coding (but not signal) end joining. *Nucleic Acids Res.*, 40, 1684–1694.
- Mathieu, J. and Bernard, R. (1987) DNA Conformational Studies from Electron Microscopy . I . Excluded Volume Effect and Structure Dimensionality. *Biopolymers*, 26, 315–326.
- 379. Brenner, S. and Horne, R.W. (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 103–110.
- 380. Booth,D.S., Avila-Sakar,A. and Cheng,Y. (2011) Visualizing Proteins and Macromolecular Complexes by Negative Stain EM: from Grid Preparation to Image Acquisition. J. Vis. Exp., 10.3791/3227.
- 381. Horne, R.W. and Pasquali Ronchetti, I. (1974) A negative staining-carbon film technique for studying viruses in the electron microscope. I. Preparative procedures for examining icasahedral and filamentous viruses. J. Ultrasructure Res., 47, 361– 383.
- 382. Robin Harris, J. and Horne, R.W. (1994) Negative staining: A brief assessment of current technical benefits, limitations and future possibilities. *Micron*, **25**, 5–13.
- 383. Dubochet, J., Ducommun, M., Zollinger, M. and Kellenberger, E. (1971) A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. *J. Ultrasructure Res.*, **35**, 147–167.
- 384. Muzard,G., Théveny,B. and Révet,B. (1990) Electron microscopy mapping of pBR322 DNA curvature. Comparison with theoretical models. *EMBO J.*, **9**, 1289–1298.
- 385. Cognet, J. a, Pakleza, C., Cherny, D., Delain, E. and Cam, E.L. (1999) Static curvature and flexibility measurements of DNA with microscopy. A simple renormalization method, its assessment by experiment and simulation. *J. Mol. Biol.*, **285**, 997–1009.
- 386. Le Cam, E., Fack, F., Murcia, J.M., Cognet, J.A.H., Barbin, A., Sarantogluo, V., Revet, B., Delain, E. and Murcia, G. (1994) Conformational analysis of a 139 Base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) Polymerase. J. Mol. Biol., 235, 1062–1071.
- 387. Beloin, C., Jeusset, J., Révet, B., Mirambeau, G., Le Hégarat, F. and Le Cam, E. (2003) Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the Bacillus subtilis LrpC protein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 5333–5342.
- 388. Veaute,X., Delmas,S., Selva,M., Jeusset,J., Le Cam,E., Matic,I., Fabre,F. and Petit,M.-A. (2005) UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in Escherichia coli. *EMBO J.*, **24**, 180–189.
- 389. Dubochet, J., Lepault, J., Freeman, R., Berriman, J.A. and Homo, J. ???C (1982) Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions. *J. Microsc.*, **128**, 219–237.
- 390. Frank, J. (2010) Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State.
- 391. Ermantraut, E., Wohlfart, K. and Tichelaar, W. (1998) Perforated support foils with predefined hole size, shape and arrangement. *Ultramicroscopy*, **74**, 75–81.
- 392. Taylor,K.A. and Glaeser,R.M. (1976) Electron microscopy of frozen hydrated biological specimens. J. Ultrasructure Res., 55, 448–456.
- 393. Lepault, J., Booy, F.P. and Dubochet, J. (1983) Electron microscopy of frozen biological suspensions. J. Microsc., **129**, 89–102.
- 394. Orlova, E. V, Rahman, M. a, Gowen, B., Volynski, K.E., Ashton, a C., Manser, C., van Heel, M. and Ushkaryov, Y. a (2000) Structure of alpha-latrotoxin oligomers reveals that divalent cation-dependent tetramers form membrane pores. *Nat. Struct. Biol.*, **7**,

48-53.

- 395. Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S.C. and Walz, T. (2004) Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell*, **116**, 565–576.
- 396. Van Heel, M. (1987) Angular reconstitution: A posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy*, **21**, 111–123.
- 397. Hall,R.J., Siridechadilok,B. and Nogales,E. (2007) Cross-correlation of common lines: A novel approach for single-particle reconstruction of a structure containing a flexible domain. *J. Struct. Biol.*, **159**, 474–482.
- 398. Knapek, E. and Dubochet, J. (1980) Beam damage to organic material is considerably reduced in cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.*, **141**, 147–161.
- 399. Conway, J.F., Trus, B.L., Booy, F.P., Newcomb, W.W., Brown, J.C. and Steven, A.C. (1993) The effects of radiation-damage on the structure of frozen-hydrated HSV-1 capsids. *J. Struct. Biol.*, **111**, 222–233.
- 400. Baker, L.A. and Rubinstein, J.L. (2010) Radiation damage in electron cryomicroscopy. *Methods Enzymol.*, **481**, 371–388.
- 401. Liu,Z., Li,Z., Zhou,H., Wei,G., Song,Y. and Wang,L. (2005) Imaging DNA molecules on mica surface by atomic force microscopy in air and in liquid. *Microsc. Res. Tech.*, **66**, 179–185.
- 402. Pastré, D., Piétrement, O., Fusil, S., Landousy, F., Jeusset, J., David, M.-O., Hamon, L., Le Cam, E. and Zozime, A. (2003) Adsorption of DNA to Mica Mediated by Divalent Counterions: A Theoretical and Experimental Study. *Biophys. J.*, **85**, 2507–2518.
- 403. Lyubchenko, Y.L., Jacobs, B.L., Lindsay, S.M. and Stasiak, A. (1995) Atomic force microscopy of nucleoprotein complexes. *Scanning Microsc.*, **9**, 705–727.
- 404. Piétrement,O., Pastré,D., Fusil,S., Jeusset,J., David,M.O., Landousy,F., Hamon,L., Zozime,A. and Le Cam,E. (2003) Reversible binding of DNA on NiCl2-treated mica by varying the ionic strength. *Langmuir*, **19**, 2536–2539.
- 405. Ostendorf, F., Schmitz, C., Hirth, S., Kühnle, A., Kolodziej, J.J. and Reichling, M. (2008) How flat is an air-cleaved mica surface? *Nanotechnology*, **19**, 305705.
- 406. Xu,L. and Salmeron,M. (1998) Effects of Surface Ions on the Friction and Adhesion Properties of Mica. *Langmuir*, **14**, 2187–2190.
- 407. Zheng, J., Li, Z., Wu, A. and Zhou, H. (2003) AFM studies of DNA structures on mica in the presence of alkaline earth metal ions. *Biophys. Chem.*, **104**, 37–43.
- 408. Crampton,N., Bonass,W.A., Kirkham,J. and Thomson,N.H. (2005) Formation of aminosilane-functionalized mica for atomic force microscopy imaging of DNA. *Langmuir*, **21**, 7884–7891.
- 409. Luda,S., Alexander,A.G. and Yuri,L. (2012) Mica functionalization for imaging of dna and protein-dna complexes with atomic force microscopy. *Methods Mol. Biol.*, 931, 295–312.
- 410. Bussiek, M. (2003) Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 137e–137.
- 411. Umemura,K., Ishikawa,M. and Kuroda,R. (2001) Controlled Immobilization of DNA Molecules Using Chemical Modification of Mica Surfaces for Atomic Force Microscopy: Characterization in Air. *Anal. Biochem.*, **290**, 232–237.
- 412. Pastré, D., Hamon, L., Landousy, F., Sorel, I., David, M.O., Zozime, A., Le Cam, E. and Piétrement, O. (2006) Anionic polyelectrolyte adsorption on mica mediated by multivalent cations: A solution to DNA imaging by atomic force microscopy under high ionic strengths. *Langmuir*, 22, 6651–6660.
- 413. Suzuki, Y., Higuchi, Y., Hizume, K., Yokokawa, M., Yoshimura, S.H., Yoshikawa, K. and Takeyasu, K. (2010) Molecular dynamics of DNA and nucleosomes in solution

studied by fast-scanning atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, **110**, 682–688.

- 414. Hamon,L., Pastré,D., Dupaigne,P., Le Breton,C., Le Cam,E. and Piétrement,O. (2007) High-resolution AFM imaging of single-stranded DNA-binding (SSB) protein--DNA complexes. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e58.
- 415. Putman,C.A.J., Van Der Werf,K.O., De Grooth,B.G., Van Hulst,N.F. and Greve,J. (1994) Tapping mode atomic force microscopy in liquid. *Appl. Phys. Lett.*, **64**, 2454–2456.
- 416. Ando, T., Kodera, N., Naito, Y., Kinoshita, T., Furuta, K. and Toyoshima, Y.Y. (2003) A High-speed Atomic Force Microscope for Studying Biological Macromolecules in Action. *ChemPhysChem*, **4**, 1196–1202.
- 417. Aebi,U. and Pollard,T.D. (1987) A glow discharge unit to render electron microscope grids and other surfaces hydrophilic. *J. Electron Microsc. Tech.*, **7**, 29–33.
- 418. Diaz, R., Rice, W.J. and Stokes, D.L. (2010) Fourier-bessel reconstruction of helical assemblies. *Methods Enzymol.*, **482**, 131–165.
- 419. Sachse, C. (2015) Single-particle based helical reconstruction—how to make the most of real and Fourier space. *AIMS Biophys.*, **2**, 219–244.
- 420. Egelman, E.H. (2007) The iterative helical real space reconstruction method: Surmounting the problems posed by real polymers. *J. Struct. Biol.*, 10.1016/j.jsb.2006.05.015.
- 421. Egelman, E.H. (2000) A robust algorithm for the reconstruction of helical filaments using single-particle methods. *Ultramicroscopy*, **85**, 225–234.
- 422. Fitzpatrick, A.W.P., Falcon, B., He, S., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Crowther, R.A., Ghetti, B., Goedert, M. and Scheres, S.H.W. (2017) Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*, **547**, 185–190.
- 423. Xu,J., Zhao,L., Xu,Y., Zhao,W., Sung,P. and Wang,H.-W. (2016) Cryo-EM structures of human RAD51 recombinase filaments during catalysis of DNA-strand exchange. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 40–46.
- 424. Tuma,R.S., Beaudet,M.P., Jin,X., Jones,L.J., Cheung,C.Y., Yue,S. and Singer,V.L. (1999) Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. *Anal. Biochem.*, **268**, 278–88.
- 425. Hellman, L. and Fried, M. (2007) Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein- Nucleic Acid Interactions. *Nat. Protoc.*, **2**, 1849–1861.
- 426. Garner, M.M. and Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: applications to components of E.coli lactose operon regulatory proteins. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3047–3060.
- 427. Carey, M.F., Peterson, C.L. and Smale, S.T. (2013) Electrophoretic Mobility-Shift Assays. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **8**, 636–639.
- 428. Ballal,R., Cheema,A., Ahmad,W., Rosen,E.M. and Saha,T. (2009) Fluorescent oligonucleotides can serve as suitable alternatives to radiolabeled oligonucleotides. *J. Biomol. Tech.*, **20**, 190–194.
- 429. Lane, D., Prentki, P. and Chandler, M. (1992) Use of gel retardation to analyze proteinnucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.*, **56**, 509–528.
- 430. Cann, J.R. (1989) Phenomenological theory of gel electrophoresis of protein-nucleic acid complexes. *J Biol Chem*, **264**, 17032–17040.
- 431. Vossen,K.M. and Fried,M.G. (1997) Sequestration stabilizes lac repressor-DNA complexes during gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **245**, 85–92.
- 432. Wu,Q., Ochi,T., Matak-Vinkovic,D., Robinson,C.V., Chirgadze,D.Y. and Blundell,T.L. (2011) Non-homologous end-joining partners in a helical dance: structural studies of XLF–XRCC4 interactions. *Biochem. Soc. Trans.*, **39**, 1387–1392.
- 433. Fu,H., Le,S., Muniyappa,K. and Yan,J. (2013) Dynamics and Regulation of RecA

Polymerization and De-Polymerization on Double-Stranded DNA. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0066712.

- 434. Subramanyam, S., Kinz-Thompson, C.D., Gonzalez, R.L. and Spies, M. (2018) Observation and Analysis of RAD51 Nucleation Dynamics at Single-Monomer Resolution. In *Methods in Enzymology*.
- 435. Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A.E., Shimi, T., Khayat, M., Ben-Harush, K., Dubrovsky-Gaupp, A., Sapra, K.T., Goldman, R.D. and Medalia, O. (2017) The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature*, **543**, 261–264.
- 436. Steinmetz, M.O., Goldie, K.N. and Aebi, U. (1997) A correlative analysis of actin filament assembly, structure, and dynamics. *J. Cell Biol.*, 10.1083/jcb.138.3.559.
- 437. Pollard, T.D. (1986) Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.*, 10.1083/jcb.103.6.2747.
- 438. Ghosal, D. and Löwe, J. (2015) Collaborative protein filaments. *EMBO J.*, **34**, 2312–20.
- 439. Lupas, A.N. and Gruber, M. (2005) The structure of α-helical coiled coils. *Adv. Protein Chem.*, 10.1016/S0065-3233(05)70003-6.
- 440. Hartmann,M.D. (2017) Functional and structural roles of coiled coils. *Subcell. Biochem.*, 10.1007/978-3-319-49674-0\_3.
- 441. Macdonald, P.R., Lustig, A., Steinmetz, M.O. and Kammerer, R.A. (2010) Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. *J. Struct. Biol.*, 10.1016/j.jsb.2010.02.004.
- 442. Hess, J.F., Voss, J.C. and Fitzgerald, P.G. (2002) Real-time observation of coiled-coil domains and subunit assembly in intermediate filaments. *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M206500200.
- 443. Esta,A., Ma,E., Dupaigne,P., Maloisel,L., Guerois,R., Le Cam,E., Veaute,X. and Coïc,E. (2013) Rad52 Sumoylation Prevents the Toxicity of Unproductive Rad51 Filaments Independently of the Anti-Recombinase Srs2. *PLoS Genet.*, **9**.
- 444. Cam,E. Le, Coi,E., Gustave,I. and Umr,C. (2018) Rad52-Rad51 association is essential to protect Rad51 filaments against Srs2, but facultative for filament formation. *Elife*, **51**, 1–24.
- 445. Dey, P. and Bhattacherjee, A. (2018) Role of Macromolecular Crowding on the Intracellular Diffusion of DNA Binding Proteins. *Sci. Rep.*, **8**.
- 446. Krepel,D., Gomez,D., Klumpp,S. and Levy,Y. (2016) Mechanism of Facilitated Diffusion during a DNA Search in Crowded Environments. *J. Phys. Chem. B*, **120**, 11113–11122.
- 447. van der Valk,R.A., Vreede,J., Qin,L., Moolenaar,G.F., Hofmann,A., Goosen,N. and Dame,R.T. (2017) Mechanism of environmentally driven conformational changes that modulate H-NS DNA-Bridging activity. *Elife*, **6**.
- 448. Williams,R.S., Moncalian,G., Williams,J.S., Yamada,Y., Limbo,O., Shin,D.S., Groocock,L.M., Cahill,D., Hitomi,C., Guenther,G., *et al.* (2008) Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair. *Cell*, **135**, 97–109.
- 449. Laurens, N., Driessen, R.P.C., Heller, I., Vorselen, D., Noom, M.C., Hol, F.J.H., White, M.F., Dame, R.T. and Wuite, G.J.L. (2012) Alba shapes the archaeal genome using a delicate balance of bridging and stiffening the DNA. *Nat. Commun.*, **3**.
- 450. Cravens, S.L. and Stivers, J.T. (2016) Comparative Effects of Ions, Molecular Crowding, and Bulk DNA on the Damage Search Mechanisms of hOGG1 and hUNG. *Biochemistry*, **55**, 5230–5242.
- 451. Cravens, S.L., Schonhoft, J.D., Rowland, M.M., Rodriguez, A.A., Anderson, B.G. and Stivers, J.T. (2015) Molecular crowding enhances facilitated diffusion of two human

DNA glycosylases. Nucleic Acids Res., 43, 4087–4097.

- 452. Riballo,E., Woodbine,L., Stiff,T., Walker,S.A., Goodarzi,A.A. and Jeggo,P.A. (2009) XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 482–492.
- 453. Normanno, D., Négrel, A., de Melo, A.J., Betzi, S., Meek, K. and Modesti, M. (2017) Mutational phospho-mimicry reveals a regulatory role for the XRCC4 and XLF Cterminal tails in modulating DNA bridging during classical non-homologous end joining. *Elife*, **6**.
- 454. Cam,E. Le, Culard,F., Larquet,E., Delain,E. and Cognet,J.A.H. (1999) DNA bending induced by the archaebacterial histone-like protein MC1. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1011–1021.
- 455. Reid,D.A., Keegan,S., Leo-Macias,A., Watanabe,G., Strande,N.T., Chang,H.H., Oksuz,B.A., Fenyo,D., Lieber,M.R., Ramsden,D.A., *et al.* (2015) Organization and dynamics of the nonhomologous end-joining machinery during DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **112**, E2575–E2584.
- 456. Roy, S., de Melo, A.J., Xu, Y., Tadi, S.K., Négrel, A., Hendrickson, E., Modesti, M. and Meek, K. (2015) XRCC4/XLF Interaction Is Variably Required for DNA Repair and Is Not Required for Ligase IV Stimulation. *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 3017–3028.
- 457. Bancaud,A., Wagner,G., Conde e Silva,N., Lavelle,C., Wong,H., Mozziconacci,J., Barbi,M., Sivolob,A., Le Cam,E., Mouawad,L., *et al.* (2007) Nucleosome Chiral Transition under Positive Torsional Stress in Single Chromatin Fibers. *Mol. Cell*, **27**, 135–147.
- 458. Joyeux, M. and Vreede, J. (2013) A model of H-NS mediated compaction of bacterial DNA. *Biophys. J.*, **104**, 1615–1622.
- 459. Le Cam, E., Frechon, D., Barray, M., Fourcade, A. and Delain, E. (1994) Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11816–11820.
- 460. Kladova,O.A., Bazlekowa-Karaban,M., Baconnais,S., Piétrement,O., Ishchenko,A.A., Matkarimov,B.T., Iakovlev,D.A., Vasenko,A., Fedorova,O.S., Le Cam,E., *et al.* (2018) The role of the N-terminal domain of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1, in DNA glycosylase stimulation. *DNA Repair (Amst).*, 64, 10–25.
- 461. Dame, R.T., Noom, M.C. and Wuite, G.J.L. (2006) Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature*, **444**, 387–390.
- 462. Chen,L., Trujillo,K., Sung,P. and Tomkinson, a E. (2000) Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26196–205.
- 463. Cary,R.B., Peterson,S.R., Wang,J., Bear,D.G., Bradbury,E.M. and Chen,D.J. (1997) DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 4267–72.
- 464. Ruan, J., Xu, C., Bian, C., Lam, R., Wang, J.P., Kania, J., Min, J. and Zang, J. (2012) Crystal structures of the coil 2B fragment and the globular tail domain of human lamin B1. *FEBS Lett.*, **586**, 314–318.
- 465. Brachner, A. and Foisner, R. (2011) Lamins reach out to novel functions in DNA damage repair. *Cell Cycle*, **10**, 3426–3427.
- 466. Gonzalo, S. (2014) DNA Damage and Lamins. Adv. Exp. Med. Biol., 773, 377-399.
- 467. Turgay, Y. and Medalia, O. (2017) The structure of lamin filaments in somatic cells as revealed by cryo-electron tomography. *Nucleus*, 10.1080/19491034.2017.1337622.
## G- Ouvrages

-Sylvie Boichot, 2000, Immobilisation de molécules d'ADN sur mica pour leur étude en microscopie à force atomique : application à l'analyse des modifications induites par un rayonnement ionisant. Thèse de doctorat.UFR des sciences et techniques. Besançon : Université de franche-Comté.

-Jérémy Amram, 2015, Etude structurale et fonctionnelle des complexes multi-protéiques de la voie de réparation NHEJ chez l'homme. Thèse de doctorat en biochimie. Laboratoire de biologie structurale et radiobiologie (Gif sur Yvette). Université Paris 11.

- Shuya Fukai, « Application of MultiBac System to Large Complexes », dans Toshiya Senda, Katsumi Maenaka, *Advanced Methods in Structural Biology*, Japon, Springer, Tokyo, 2016, pp. 47-65.



Titre : Études structurales et fonctionnelles des complexes multi-protéiques impliqués dans la voie NHEJ humaine

Mots clés : réparation des CDBs d'ADN, NHEJ, complexe de ligation

Chez les mammifères, la réparation des CDBs par la voie NHEJ (Non Homologous End Joining) implique plusieurs complexes multi-protéines : (i) de reconnaissance (ADN-Ku70/Ku80), (ii) de maturation et (iii) de ligation comprenant XRCC4, XLF et Ligase IV. Si les protéines impliquées dans le NHEJ sont connues, leurs propriétés structurales et fonctionnelles le sont moins. Au cours de ma thèse, j'ai combiné des approches biochimiques, de Microscopies Électronique et à Force Atomique, pour caractériser les propriétés de XRCC4, de XLF et leurs interactions avec le complexe de reconnaissance en particulier Ku. J'ai montré que la protéine complète XRCC4 est capable de polymériser et former des filaments alors qu'elle ne peut pas en faire en absence de la région Cterminale. Par Microscopies Électronique et à Force Atomique; nous avons montré que le filament XRCC4 forme une structure hélicoïdale de chiralité gauche. XLF seule ne forme pas de filament mais peut être incorporé dans le filament XRCC4, ce que nous avons montré par immunomarquage. L'analyse d'images réalisées en collaboration et avec l'algorithme d'Egelman E. (Université de Virginie-USA) a permis d'obtenir une reconstruction 3 D du filament XRCC4. Il est composé de 2 filaments enroulés

l'un autour de l'autre avec un pas de 54 nm. Des Études sont en cours afin d'obtenir une structure 3D en CryoEM à haute résolution. L'étude des propriétés physicochimiques de l'assemblage du filament en fonction de la concentration, la température et le temps d'incubation a permis de montrer la dynamique du filament avec une stabilisation à basse température, et une concentration située entre 50 et 250 nM. L'ADN avec ou sans extrémités interagit avec les filaments. Cette interaction stabilise et promeut l'extension du filament. L'incorporation de XLF stabilise aussi le filament XRCC4. L'analyse des complexes formés entre l'ADN et XRCC4 ou XLF à l'état oligomérique montre des événements de pontage intra ou intermoléculaires. Parallèlement, nous avons étudié les propriétés de reconnaissance de l'ADN par l'hétérodimère Ku70/Ku80 et avons montré que le domaine KBM de XLF interagit avec Ku80 au sein de l'hétérodimère. En conclusion, nous montrons que le filament XRCC4 pourrait jouer un rôle d'architecture en maintenant les extrémités physiquement proches. Le recrutement de XLF dans le filament XRCC4 permettrait d'assembler le complexe de ligation avec le complexe de reconnaissance grâce aux interactions entre Ku et XLF.

**Title**: Structural and Functional study of multi protein complexes involved in human non homologous end joining pathway **Key words**: DSB repair, NHEJ, ligation complex

In mammals, DSBs repair by the Non Homologous End Joining (NHEJ) pathway involves several multi-protein complexes: (i) the recognition complex (the Ku70 / Ku80 heterodimer), (ii) the maturation complex and (iii) the ligation complex comprising XRCC4, XLF, PAXX and Ligase IV. If the proteins involved in NHEJ are identified and characterized, their structural and functional properties are often poorly understood. During my thesis I combined biochemical approaches, and molecular microscopies (Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy), to characterize the properties of XRCC4, XLF and their interactions with the recognition complex (Ku-DNA). I have shown that the full-length XRCC4 forms oligomers in solution (dimers and tetramers) and it polymerize into filaments whereas it can't do it when the C-terminal region is absent. Using Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy we showed that the XRCC4 filament forms a helical structure of the left chirality. XLF alone does not form a filament but can be incorporated into the XRCC4 filament, which we have shown by immunostaining. In collaboration with Egelman E. (University of Virginia-USA), the image analysis performed using his algorithm allowed us to obtain a3D reconstruction of the XRCC4 filament. It consists of 2 filaments wound around each other in a helical manner with a pitch of 54 nm. Studies in CryoEM are in progress to obtain a 3D high-resolution structure. The study of the physicochemical properties of the filament assembly as a function of the concentration, the temperature and the incubation time allowed to show the dynamics of the filament with stabilization at low temperature, and a concentration

between 50 and 250 nM. DNA with or without ends interacts with the filaments. This interaction stabilizes and promotes the extension of the filament. Similarly, incorporation of XLF stabilizes the XRCC4 filament but can be incorporated into the XRCC4 filament, which we have shown by immunostaining with gold beads. In collaboration with Edward Egelman (University of Virginia-USA), the image analysis performed using his algorithm allowed us to obtain a 3D reconstruction of the XRCC4 filament. It consists of 2 filaments wound around each other in a helical manner with a pitch of 54 nm. Studies in CryoEM are in progress to obtain a 3D high-resolution structure. The study of the physicochemical properties of the filament assembly as a function of the concentration, the temperature and the incubation time allowed to show the dynamics of the filament with stabilization at low temperature, and a concentration between 50 and 250 nM. DNA with or without ends interacts with the filaments. This interaction stabilizes and promotes the extension of the filament. Similarly, incorporation of XLF stabilizes the XRCC4 filament. Analysis of complexes formed between DNA and XRCC4 or XLF in the oligomeric state shows intra- or intermolecular bridging events. In parallel, we have studied the DNA recognition properties of the Ku70/Ku80 heterodimer and we have shown that KBM domain of XLF interacts with Ku80 within the heterodimer. In conclusion, we show that the XRCC4 filament could play an architectural role favoring repair events by keeping the ends physically close. The recruitment of XLF into XRCC4 filaments and its interaction with Ku allows the link between ligation and recognition complexes.