



université de bretagne  
occidentale



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : Biochimie-Microbiologie*

**École Doctorale des Sciences de la Mer**

présentée par

**Gaëlle Hogrel**

Préparée au Laboratoire de Microbiologie des  
Environnements Extrêmes (LM2E)  
UMR6197, Ifremer, CNRS, UBO

# **Interactions entre composants de la maintenance génomique chez les *Archaea* hyperthermophiles:**

**Étude des associations entre  
PCNA et le complexe Mre11-Rad50  
et entre les hélicases MCM et XPD**

**Thèse soutenue le 7 Décembre 2015**

devant le jury composé de :

**Gaëlle LEGUBE**

Chargée de recherche, LBCMCP, Université Paul Sabatier de  
Toulouse / *Rapporteur*

**Patrick FORTERRE**

Professeur, I2BC, Université Paris-Saclay / *Rapporteur*

**Bruno FRANZETTI**

Directeur de recherche, IBS, Grenoble / *Examineur*

**Mohamed JEBBAR**

Professeur, LM2E, UBO / *Examineur*

**Laurent TERRADOT**

Chargé de recherche, IBCP, Lyon / *Examineur*

**Didier FLAMENT**

Chercheur, LM2E, Ifremer, Brest / *Examineur*,  
*Directeur de thèse*





## REMERCIEMENTS

Financée par l'Université de Bretagne Occidentale, cette thèse a été réalisée au sein de Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes au centre Ifremer de Brest.

*Et puisque les interactions sont au cœur de nombreux processus, je tenais à remercier l'ensemble des personnes avec qui j'ai pu interagir durant ces trois dernières années.*

Un grand merci à Didier Flament, mon directeur de thèse, qui a su me guider en toute sérénité sur la Voie de la Recherche. Grâce à toi, Didier, j'ai découvert le monde incroyable des archées avec tous ses mystères et sa complexité. Je te remercie sincèrement pour ton soutien à la fois scientifique et professionnel mais aussi humain.

Je tiens à remercier les membres du jury, Gaëlle Legube, Patrick Forterre, Bruno Franzetti et Laurent Terrado, venant de Toulouse, Paris, Grenoble et Lyon, qui ont accepté de venir jusqu'à Brest pour évaluer ce travail. Un merci particulier à Mohamed Jebbar pour son soutien durant cette thèse en tant que membre du comité de thèse et maintenant examinateur. Merci également de m'avoir accueillie au sein de l'unité de recherche du LM2E. Merci aux membres de mon comité de thèse, Magali Le Breton et Bertrand Cosson, pour leur investissement et leurs précieux conseils durant ce travail.

Je remercie également Elisabeth Bondu et Frédéric Jean de l'EDSM pour leur investissement dans cette école doctorale et pour la bourse ayant en grande partie financé ma participation à un congrès outre Atlantique. Congrès auquel j'ai eu l'opportunité de rencontrer Gareth Williams que je remercie à distance pour l'enthousiasme et l'intérêt suscité pour cette étude.

*J'en arrive aux remerciements destinés à tous les collègues du LM2E.*

Un merci bien évidemment à l'équipe réplique pour m'avoir donné la chance d'appréhender les mécanismes de la maintenance génomique des archées. Merci à tous ses membres, actuels et passés: Aline, Audrey, Sébastien, Tom, Ghislaine, Etienne, Mélanie, Alexia, Yang, Pierre-François, Céline. Encore merci pour tous les moments partagés à la paillasse, en réunion et dans les bureaux.

Un grand merci Sébastien, à la fois the Labcollector man et the lord of SPR, pour ton investissement, tout tes conseils aussi bien pour les manips que pour le footing. Un jour, on tentera de nouveau le lièvre et la tortue ou alors bipbip et coyote, à toi de choisir le costume. Docteur Pluchon, merci à toi pour ton travail sur les réseaux qui m'ont fourni ce sujet de thèse (même si je t'ai probablement maudit parfois ;)). Et surtout merci d'être venu aux nouvelles régulièrement, ainsi que pour l'information du congrès, c'est quand tu veux pour repartir faire une journée de ski à Whistler ! Audrey, comment remercier ma collègue de bureau qui a su supporter mes étrennements quotidiens dans la bonne humeur. Puis j'ai eu de la chance d'avoir une collègue aussi gourmande que moi, et surtout merci pour ton soutien moral dans la dernière ligne droite. Tom, je m'excuse pour les cours de français que je n'ai pas su te donner. Je te remercie pour tes précieux conseils et ton humour british aux « what if ».

Aline, merci beaucoup pour ton soutien à la paillasse, ta persévérance avec une certaine protéine, les séances papotages et tous les moments partagés durant ces trois et quelques années. Avec Sandrine, les Totally Spies sont réunies comme dirait Matthieu. Sandrine, Matthieu, nous avons démarré ensemble la Thèse. Cela commence à être difficile d'aligner ces mots sans un petit pincement au cœur, à se dire que dans quelques mois nous nous éloignerons géographiquement. Je tenais à vous remercier plus particulièrement pour ces dernières semaines, pour ces moments de craquage et de fous rires et simplement pour avoir été là.

Plus généralement merci à tous les membres du laboratoire Ifremer/IUEM avec qui j'ai passé trois années riches, en rencontres, discussions, partages, rires, pauses cafés, barbecue, ... Je souhaiterais pouvoir remercier chacun d'entre vous plus personnellement, mais le sommeil va me manquer, je n'ajouterai donc que quelques mots. À nos secrétaires, Christine et Stéphanie qui ont plus d'un tour dans leur sac pour les dépannages administratifs. Merci à vous deux ! À tous les doctorants du LM2E, jeunes et plus vieux : merci à vous tous et bonne chance les amis ! À la team Newsletter : je compte sur votre plume pour que les prochaines newsletters soient intemporelles. ;)

C'est à ce moment-là que je commence à réaliser que c'est la fin d'une formidable aventure. À tous, je souhaite une bonne continuation ici ou ailleurs, en espérant qu'un jour nos chemins se croisent de nouveau.

*À présent je m'éloigne un peu de la sphère du labo pour les derniers remerciements.*

Merci à la fine équipe de grimpeurs avec qui j'ai pu m'évader le temps d'une soirée ou d'un week-end à travers les blocs de roches et les falaises. Aux amis de Toulouse, dispersés aux quatre coins de la France avec qui c'est toujours un plaisir de se retrouver et qui malgré la distance sont toujours présents. À Emeric, pour m'avoir évité de sombrer dans des crises rédactionnelles trop intenses ces dernières semaines.

Puis pour finir, un immense merci à mes parents et à mon frère, pour leur soutien depuis toujours. Grâce à vous j'ai pu vivre cette aventure dans d'excellentes conditions.

*Sans toutes ces interactions, cette thèse n'aurait pas été la même.*

*Et si aujourd'hui on me demandait : « C'est une bonne situation, ça doctorant ? »*

*Je sais que je répondrais sans hésiter : « Mais vous savez, moi je ne crois pas qu'il y ait de bonnes ou de mauvaises situations...je dirais que c'est d'abord des **expériences** et des **rencontres** ! »*



# SOMMAIRE

Préface .....	11
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	13
I.  Abysses et <i>Archaea</i> .....	14
1.  Des milieux extrêmes bien vivants .....	14
2.  Vous avez-dit extrême ? .....	16
3.  Les <i>Archaea</i> , des procaryotes « supérieurs » ? .....	19
II. <i>Archaea</i> et ADN .....	21
1.  L'ADN à haute température .....	21
2.  Réplication, ou comment photocopier l'ADN .....	23
3.  La Recombinaison pour réparer l'ADN endommagé .....	26
III.  De l'interaction à la fonction .....	31
1.  Réseau d'interaction de la maintenance génomique .....	31
2.  Nouvelles interactions, pour quelle(s) fonction(s) ? .....	33
CHAPITRE I: PCNA/MRE11-RAD50 .....	35
I.  Présentation des protéines .....	37
1.  PCNA .....	37
2.  Mre11-Rad50 .....	43
3.  Objectif de l'étude .....	56
II.  Résultats .....	58
1.  Protéines .....	58
2.  Apprivoiser les activités nucléases de <i>PfuMR</i> .....	60
3.  Quand <i>le complexe MR</i> rencontre PCNA .....	69
III.  Article : interaction <i>PfuPCNA / PfuMR</i> .....	71
IV.  Informations supplémentaires .....	99
1.  Matériels et méthodes .....	99
2.  Résultats .....	102
V.  Discussion et perspectives .....	109
1.  D'une association physique, .....	109
2.  À l'interaction fonctionnelle .....	111
3.  Pour quel rôle chez les archées ? .....	113
CHAPITRE II : MCM/XPD .....	117
I.  Présentation des protéines .....	118
1.  MCM .....	118

2. XPD.....	122
3. Intérêt d'une interaction entre hélicases.....	126
Objectif de l'étude.....	129
II. Matériels & méthodes.....	130
1. Protéines.....	130
2. Oligonucléotides et substrats ADN.....	132
3. Activité hélicase et fluorescence.....	133
III. Résultats.....	138
1. Du clonage à la production de <i>Pab</i> XPD.....	138
2. Caractérisation de <i>Pab</i> MCM.....	141
IV. Discussion et perspectives.....	151
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	155
VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	159
TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX.....	163
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	167
ANNEXES.....	180
Annexe 1 : domaine des Archaea.....	181
Annexe 2 : Purification des protéines.....	182
Annexe 3 : substrat ADNdb.....	185
Annexe 4 : Principe méthodologique de SPR.....	186
Annexe 5 : Procédure de modélisation de l'interaction PCNA/MR à partir des données SPR.....	189
Annexe 6 : Purification des hélicases.....	192
Annexe 7 : Séquences MCM/XPD.....	193



## GLOSSAIRE

Abréviations	Signification
ABC	ATP Binding Cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	ADN double brin
ADNsb	ADN simple brin
A-NHEJ	Alternative Non Homologous End Joining
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BER	Base Excision Repair
BSA	Bovin serum albumin
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
His-tag	Etiquette d'histidine
HR	Homologous Recombination
IDCL	InterDomain Connector Loop
LB	Lysogeny Broth
MMR	Mismatch Repair
MR	Mre11-Rad50
NER	Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Non Homologous End Joining
nt	Nucléotide
Pab	<i>Pyrococcus abyssi</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIP	PCNA Interacting Protein
RBD	Rad50 Binding Domain
SPR	Surface plasmon resonance
TBE	Tris borate EDTA

### Glossaire des protéines

GAN	Gins Associated Nuclease
GINS	<i>go, ichi, nii, san</i> (cinq, un, deux, trois en japonais)
MCM	Minichromosome Maintenance Complex
MR	Mre11-Rad50
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
RFC	Replication Factor C
RPA	Replication Protein A
SSB	Single Strand Binding protein
XPD	Xeroderma Pigmentosum protein D



« Interaction: relation interpersonnelle entre deux individus au moins, par laquelle les comportements de ces individus s'influencent mutuellement et se modifient chacun en conséquence » (Larousse).

Entre êtres humains ou entre molécules, à l'échelle de l'univers ou à celle de l'atome, les interactions ont un rôle prépondérant dans la dynamique de systèmes élaborés. Au cœur des cellules, les interactions sont des contacts entre biomolécules, qui régissent bon nombre de processus biologiques. À travers l'étude d'interactions entre protéines, nous allons dans ce manuscrit explorer des mécanismes, assurant la transmission et l'intégrité de l'information génétique portée par l'ADN. Mais avant cela, c'est une plongée dans les abysses qui nous attend pour en remonter quelques microbes de l'extrême.



# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

---

## *Des Abysses à l'ADN*

### **Plan :**

#### I. Abysses et *Archaea*

1. Des milieux extrêmes bien vivants
2. Vous avez-dit extrême ?
3. Les *Archaea*, des procaryotes « supérieurs »

#### II. *Archaea* et ADN

1. L'ADN, à haute température
2. Réplication, ou comment photocopier l'ADN
3. La Recombinaison pour réparer l'ADN endommagé

#### III. De l'interaction à la fonction

1. Réseau d'interaction de la maintenance génomique
2. Nouvelles interactions, pour quelle(s) fonction(s) ?

## I. ABYSSES ET ARCHAEA

« *Quand j'étais enfant, je pensais que le monde entier avait déjà été découvert et cartographié. Pourtant j'ai passé une grande partie de ma vie professionnelle à explorer un monde encore inconnu : les abysses, un milieu extrême qui occupe plus des trois-quarts de notre biosphère.* »

*Daniel Desbruyères, 2010, Les Trésors des Abysses.*

### 1. DES MILIEUX EXTRÊMES BIEN VIVANTS

Si nous pensions en avoir terminé avec l'exploration de notre planète bleue, c'était sans compter les 75 % d'eau océanique que représentent les **Abysses**. Bien souvent le nom abysses englobe toutes les eaux marines profondes en deçà des 2000 mètres. Chez les océanographes, on parle d'étage abyssal pour les grandes plaines qui s'étendent depuis le pied du talus continental jusqu'aux abords des grandes fosses (Figure 1). La profondeur moyenne de l'océan Atlantique est aux alentours de 3300 mètres (Pidwirny, 2013). Dans le Pacifique des scientifiques sont allés effectuer des prélèvements jusqu'à 11 000 mètres de profondeur au site le plus profond connu, *Challenger Deep*, dans la fosse des Mariannes (Glud et al, 2013). Grâce au développement des technologies d'exploration profonde, les scientifiques en apprennent un peu plus tous les jours sur ces profondeurs qui ne manquent pas de de vie.

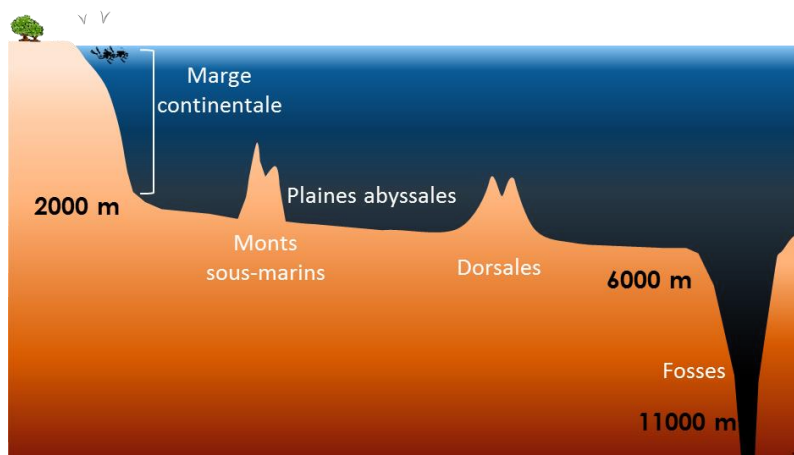
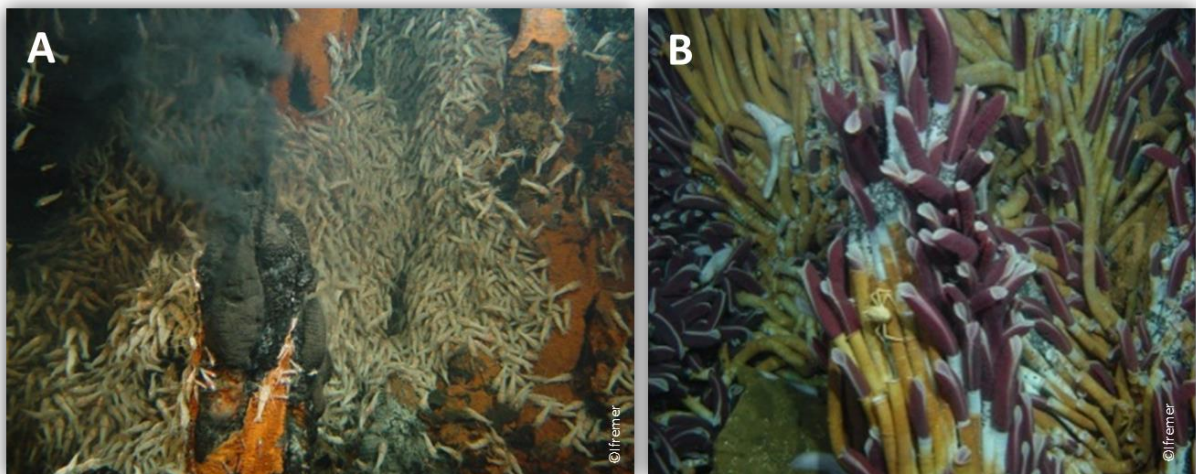


Figure 1. Représentation schématique de la distribution des profondeurs océaniques.

Schéma adapté de Desbruyères, 2010.

---

Pendant longtemps il était commun de parler de désert abyssal, aujourd'hui on sait que la vie se développe dans des écosystèmes profonds tels que les sources hydrothermales, les zones d'émission de fluides froids et parfois même dans des milieux improbables comme les carcasses de baleines. Si l'on prend l'exemple des écosystèmes hydrothermaux sous-marins, de grands vers accompagnés de bivalves et de crevettes colonisent les parois de cheminées hydrothermales (Figure 2) et cela malgré l'absence de lumière. Est à l'origine des édifices hydrothermaux, de l'eau de mer froide qui s'infiltré dans les anfractuosités de la croûte océanique et qui en se réchauffant à proximité du magma va remonter à travers la croûte et jaillir par des événements pour se mélanger de nouveau à l'eau de mer froide. Ce fluide hydrothermal peut atteindre les 400°C et est chargé en métaux et minéraux (lithium, potassium, calcium, fer, cuivre, manganèse, zinc, ...) à la sortie des cheminées. La précipitation de ces composés au contact de l'eau froide et oxygénée forme les structures des cheminées qui varient suivant la nature des sites hydrothermaux. À travers ces composés chimiques, c'est une véritable source d'énergie qui est à la disposition des organismes capables de chimiosynthèse qui deviennent à leur tour la base de la chaîne alimentaire.



**Figure 2. La vie à proximité d'une cheminée hydrothermale profonde, des colonies de crevettes *Rimicaris exoculata* (A), et des vers *Riftia pachyptila* (B). Campagne Exomar 2005 – Site TAG (3650 m) (Ifremer).**

---

Mais la pauvreté en nutriments n'est pas le seul facteur auquel doivent faire face les organismes. En plus de la haute pression hydrostatique liée à la profondeur, dans cet habitat les conditions physico-chimiques telles que la température et le pH varient fortement sur des distances de l'ordre du centimètre. Ajouté à tout cela, l'environnement des cheminées hydrothermales présenterait une radioactivité naturelle plus élevée que la normale avec des radioéléments tels que l'uranium, le plomb ou encore le polonium (Charmasson et al, 2009). La communication à ce sujet est toutefois assez pauvre car les données encore peu nombreuses.

Cet habitat aux conditions hostiles est considéré comme un environnement extrême et ses habitants, des **extrémophiles**.

## 2. VOUS AVEZ-DIT EXTRÊME ?

Le terme extrémophile s'emploie pour tous les organismes, vivants dans des conditions environnementales bien différentes de celles définies comme standard. Le caractère extrême peut varier: thermophilie (haute température), piezophilie (haute pression), acidophilie (pH acide), halophile (forte salinité) (Tableau 1). Parfois, on parle même de polyextrémophiles car certaines espèces peuvent endurer comme *Sulfolobus acidocaldarius* une haute température ( $T^{\text{opt}} = 85^{\circ}\text{C}$ ) et vivre à un pH très acide (pH 3).

**Tableau 1. Quelques exemples d'extrémophiles appartenant au domaine des *Archaea*.**

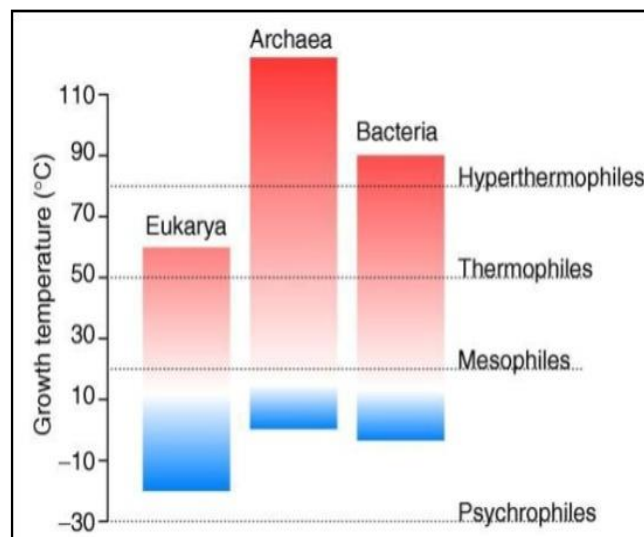
Caractère extrémophile	Organisme	Paramètre	Référence
<b>Psychrophile</b>	<i>Methanococcoïdes burtonii</i>	$T^{\circ}_{\text{théo}} = -2,5^{\circ}\text{C}$	Franzmann et al, 1992
<b>Hyperthemophile</b>	<i>Pyrolobus fumarii</i>	$T^{\circ}_{\text{max}} = 113^{\circ}\text{C}$	BlochI et al, 1997
<b>Piezophile</b>	<i>Pyrococcus yayanosii</i>	$P_{\text{max}} = 120 \text{ MPa}$	Zeng et al, 2009
<b>Halophile</b>	<i>Haloarcula marismortui</i>	$[\text{NaCl}] = 3,9 \text{ M}$	Oren et al, 1990
<b>Acidophile</b>	<i>Picrophilus torridus</i>	pH = 0,6	Schleper et al, 1995
<b>Alcalophile</b>	<i>Thermococcus acidamonivorans</i>	pH = 9	Dirmeier et al, 1998
<b>Radioactivité</b>	<i>Thermococcus gammatolerans</i>	5 000 Gy	Jolivet et al, 2003



En ce qui concerne le paramètre de température, le terme mésophile, désigne les êtres vivants qui, comme nous êtres humains, se développent dans une gamme de température entre 10 et 50°C. Au delà, les organismes ayant des températures de croissance optimale entre 50 et 80°C sont dits thermophiles puis hyperthermophiles quand cela dépasse les 80°C (Figure 3). A *contrario*, la psychrophilie désigne les organismes se développant à des températures inférieures à 10°C. Le record de haute température est détenu par une archée, *Pyrolobus fumarii* qui a une croissance optimale à 113°C.

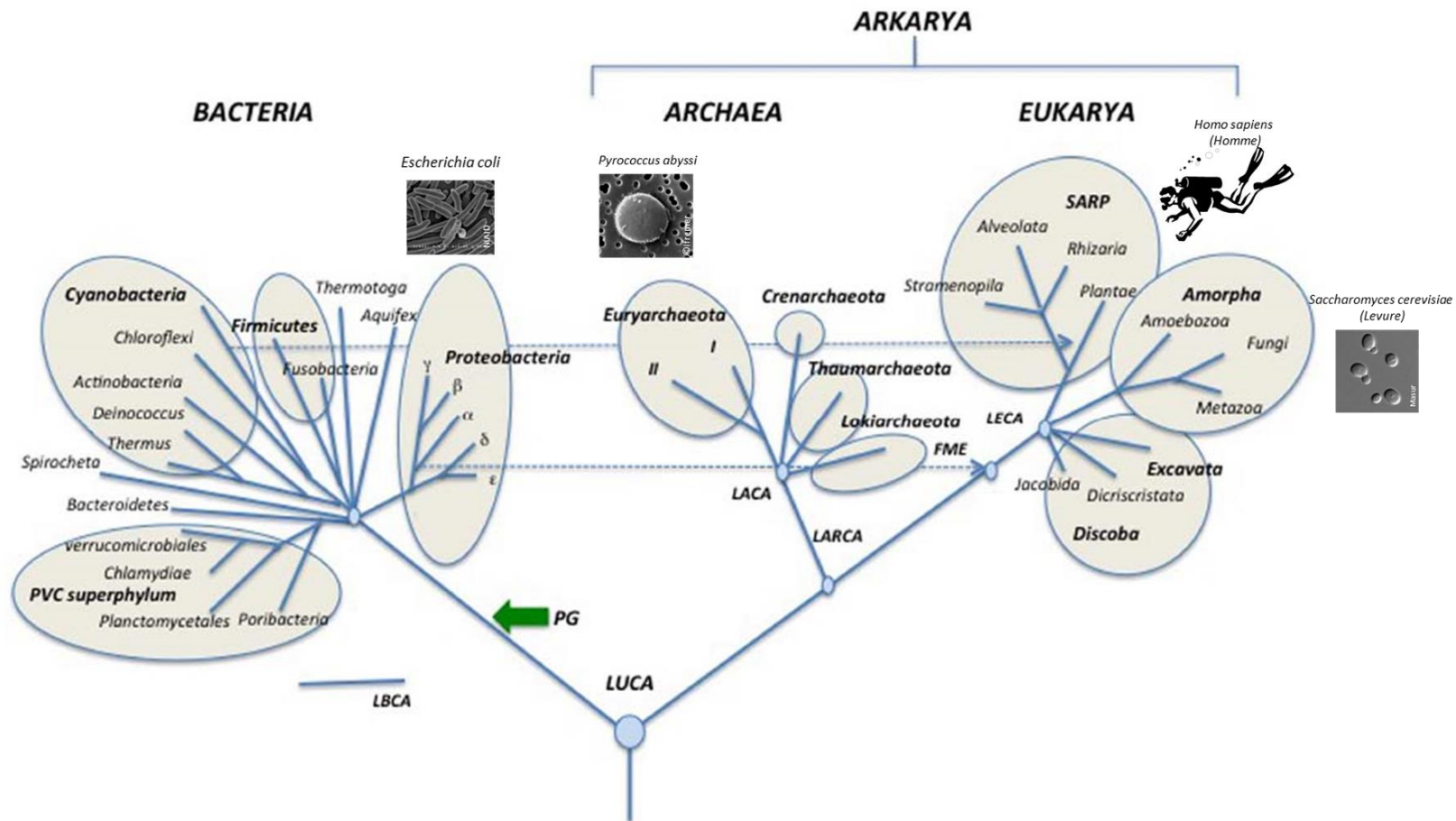
Quelques eucaryotes vivent parmi les extrémophiles, tel que le ver de Pompéi, *Alvinella pompejana*, qui vit sur les parois de cheminées hydrothermales et régulerait sa température autour de 50°C (Le Bris et al, 2005). Mais on retrouve majoritairement des micro-organismes (bactéries, archées, virus), dont les archées, qui vont nous intéresser plus particulièrement. Car même si elles n'occupent pas exclusivement des niches écologiques dites extrêmes, depuis leur découverte elles se sont avérées être des modèles d'étude unique en ce qui concerne les mécanismes d'adaptations physiologiques.

Mais qui sont ces archées qui constituent le troisième domaine du vivant des *Archaea* ?



---

Figure 3. La thermophilie dans les trois domaines du vivant (Hickey & Singer, 2004).



**Figure 4. L'arbre universel du vivant : version adaptée de l'arbre de Woese et al, 1990 et mise à jour par Forterre, 2015.**

*Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya* constituent les trois domaines du vivant actuellement reconnus. Arkarya est une proposition pour regrouper le domaine *Archaea* avec *Eucarya* pour un arbre à deux domaines. Les termes LUCA, LBCA, LARCA, LACA et LECA désignent le dernier ancêtre commun de chaque embranchement (Last Universal / Bacterial / Arkarya / Archaeal / Eucaryotic Common Ancestor). Dans cette version simplifiée tous les phylums ne sont pas représentés.

### 3. LES *ARCHAEA*, DES PROCARYOTES « SUPÉRIEURS » ?

Depuis l'Antiquité on cherche à classer chaque espèce vivante les unes par rapport aux autres, plantes et animaux initialement, jusqu'aux microbes aujourd'hui. Au fil des siècles cette classification du vivant a beaucoup évolué et continue encore d'être modifiée. Elle est représentée sous la forme d'un arbre dont les racines mènent au dernier ancêtre commun de tout être vivant : LUCA (*Last Universal Common Ancestor*).

La distinction des espèces se basait entre autres sur l'organisation cellulaire ayant ainsi distingué les espèces procaryotes (« avant noyau ») des espèces eucaryotes (« vrai noyau »). Ce qui est appelé « noyau » est en réalité un compartiment intracellulaire délimité par une membrane dans lequel est renfermé, chez les eucaryotes, le matériel génétique. Le développement des technologies de séquençage de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) a permis de proposer une classification basée sur des critères génétiques pour aider à construire l'arbre phylogénétique. Localisées dans les ribosomes des cellules, de petites molécules d'ARN (Acide RiboNucléique), les ARN ribosomiaux, sont présentes dans tous les organismes vivants avec la même fonction biologique. Dans les années 70, la comparaison de ces ARN ribosomiaux permit à C.R. Woese et G.E. Fox de distinguer deux domaines parmi les procaryotes : les *Bacteria* comprenant les bactéries déjà identifiées et le domaine des *Archaea* (du grec « ancien ») aussi appelées archéobactéries à l'époque (Woese & Fox, 1977).

Depuis, l'arbre universel se compose de trois domaines du vivant : *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*. La Figure 4 est une version de l'arbre de Woese et al, 1990 mis à jour récemment pour tenir compte des avancées dans les analyses phylogénétiques et des dernières découvertes dans le domaine des *Archaea* (Forterre, 2015). Les virus ne remplissant pas les critères qui définissent les êtres vivants ne sont pas représentés dans cet arbre. Ils sont toutefois étroitement liés à chacun des trois domaines, car même une bactérie extrémophile a le droit à son virus attitré (Lossouarn et al, 2015).

Dans la suite du manuscrit, les noms communs bactérie, archée et eucaryote seront généralement utilisés pour désigner les espèces de chacun des trois domaines du vivant.

La branche des archées est aujourd'hui subdivisée en cinq *phyla*: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Korarchaeota et Lokiarchaeota (Annexe1). Les deux grands règnes des Crenarchaeota et Euryarchaeota sont les plus étudiés à ce jour. Le dernier *phylum* à être identifié est celui des Lokiarchaeota dont l'espèce représentante a été prélevée depuis des sédiments marins à proximité d'une cheminée hydrothermale profonde en Arctique (Spang et al, 2015).

Deux espèces vont plus particulièrement nous intéresser : *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) et *Pyrococcus abyssi* (*Pab*), respectivement surnommées la boule de feu furieuse et la boule de feu des abysses. *Pfu* et *Pab* sont des Thermococcales inclus dans le phylum des Euryarchaeota (sub-division I) et toutes deux sont des hyperthermophiles (Tableau 2).

**Tableau 2. Caractéristiques de deux Euryarchées hyperthermophiles.**

		<i>Pyrococcus abyssi</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Identification	Phylum / Ordre	Euryarchaeota I / Thermococcales	
	Site	Source hydrothermale, océan Pacifique profondeur: 2 000 m	Mer de l'île Vulcano, Italie profondeur: 0,5 m
	Référence	Erauso et al, 1993	Fiala & Stetter, 1986
Caractéristiques	Coque	0,8 à 2 µm	0,8 à 2,5 µm
	Hyperthermophilie	✓ de 68° à 101,5°C T° <sub>opt</sub> = 96°C	✓ de 67 et 103 °C T° <sub>opt</sub> = 100 °C
	Piézophilie	✓ Piézophile non obligatoire P <sub>max</sub> : 40 MPa	× Piézosensible
	Anaérobie	✓	✓
Génome	Référence	Cohen et al, 2003	Robb et al, 2001
	Taille	1,77 Mb Plasmide pGT5: 3,5 kb	1,91 Mb

Cette vie à haute température n'est pas sans conséquence sur la cellule et ses composants, dont l'ADN.

## II. ARCHAEA ET ADN

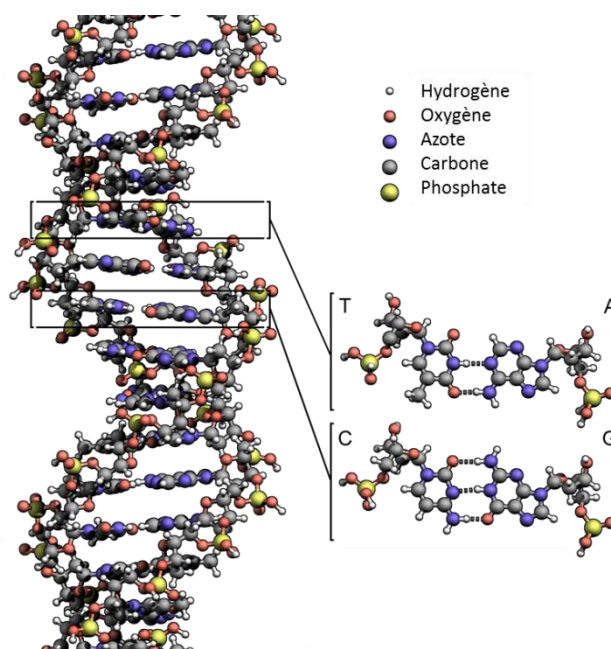
« Grâce à leurs membranes particulières, à leurs protéines résistantes, les hyperthermophiles sont adaptés aux températures élevées. Certes, mais encore faut-il que l'ADN qui renferme l'information génétique [...] ne soit pas lui-même détérioré. »

Daniel Prieur, 2014, Les bactéries de l'extrême : des abysses à l'espace.

### 1. L'ADN À HAUTE TEMPÉRATURE

L'ADN est au cœur des préoccupations de la société. Cette année, le prix nobel de chimie a été décerné à des scientifiques ayant œuvré pour la compréhension des mécanismes de réparation de l'ADN : Thomas Lindhal, Paul Modrich et Aziz Sancar.

Support de l'information génétique de tout être vivant, la molécule d'ADN se présente sous la forme d'une double hélice constituée par un enchaînement de quatre nucléotides, les briques de notre code génétique, liés par les liaisons phosphodiesters. Deux brins d'ADN complémentaires interagissent *via* ces nucléotides qui établissent des ponts hydrogènes : l'Adénine (A) avec la Thymines (T) et la Cytosine (C) avec la Guanine (G) (Figure 5).



**Figure 5. La double hélice d'ADN**

Enchaînement de quatre nucléotides Adénine (A), Thymines (T), Cytosine (C) et Guanine (G) qui interagissent deux à deux *via* des liaisons hydrogènes pour former avec un brin complémentaire une double hélice. Schéma adapté de Zephyris *via* Wikimedia commons.

À haute température la double hélice subit plusieurs effets :

- la dénaturation des deux brins complémentaires qui se désolidarisent et provoque la perte de la structure hélicoïdale,
- la rupture des liaisons phosphodiester composant le squelette de l'ADN,
- et la dégradation chimique des nucléotides : rupture de la liaison entre la base et le sucre (dépuration) et désamination de l'adénine et de la cytosine.

Par extrapolation à 100°C et dans un contexte acellulaire, l'ADN devrait subir 3000 fois plus de lésions qu'à 37°C (Lindahl, 1993). Pourtant à 100°C, l'ADN de l'archée hyperthermophile *P. furiosus* est 20 fois plus résistant aux dommages liés à la température que chez *E. coli* (Peak et al, 1995). Suite à leurs observations sur la capacité de l'ADN à résister aux hautes températures, Peak *et al.*, émettent l'hypothèse de deux mécanismes : soit l'ADN est recouvert d'une couche protectrice de molécules telles que des protéines chromatinienne, ou alors la cellule dispose de mécanismes de réparation exceptionnellement efficaces et capables d'agir à haute température.

Suite à différentes recherches menées principalement sur la résistance des hyperthermophiles aux radiations, la balance a penché vers cette seconde hypothèse. En 2001, Gérard *et al.* publient l'article au titre révélateur : « Les mécanismes de protection de l'ADN ne sont pas impliqués dans la résistance aux radiations chez les archées hyperthermophiles *P. abyssi* et *P. furiosus* ». Suite à une exposition à des rayonnements  $\gamma$ , ils ont pu observer que le chromosome des deux archées hyperthermophiles *P. furiosus* et *P. abyssi*, celui de la bactérie mésophile *E. coli* et celui de la bactérie radiorésistante *D. radiodurans*, présentait un taux de cassure double brin similaire. Pourtant lorsque *P. abyssi*, *P. furiosus* et *D. radiodurans*, étaient replacés dans leur milieu de culture ils étaient capables de reconstituer leur chromosome (Gerard et al, 2001) avec un taux de mutation spontanée chez ces espèces proche de celui de *E. coli* (Grogan et al, 2001). Tout ceci suggère donc la présence d'un système de réparation performant.

Nous allons maintenant plonger au coeur de ces mécanismes de la maintenance génomique et nous rendre compte que les archées bien que physiologiquement différentes des eucaryotes, sont plus proches de nous que nous pouvions l'imaginer. La ressemblance la plus surprenante entre les archées et les eucaryotes est observée dans la réplication de l'ADN, l'un des processus les mieux conservés du vivant ; les composants de la machinerie de réplication des archées s'apparentent étroitement à une version simplifiée du système de réplication eucaryote.

## 2. RÉPLICATION, OU COMMENT PHOTOCOPIER L'ADN

Pour la cellule qui veut dupliquer son génome afin de le transmettre à ses cellules filles, la réplication de l'ADN est un processus fondamental. Il est également l'un des plus surveillé si la cellule ne veut pas altérer l'information génétique. Une altération serait à l'origine de dysfonctionnement qui peut se répercuter à l'échelle d'un organisme complexe comme l'humain.

Le principe de base de la réplication est simple: scanner l'ADN pour en effectuer une copie. En pratique, cela implique une coordination complexe de nombreux éléments au sein de la cellule dont les **protéines** sont les principales actrices. C'est un véritable ballet qui s'organise à la fourche de réplication.

### PROTÉINES

= Macromolécules d'une grande diversité impliquées dans les processus biologiques.

« *Les protéines sont l'incarnation de la transition d'un monde unidimensionnel de séquence vers un monde de molécules tridimensionnelles.* »

Pr. Grégory De Crescenzo.

Cours de biochimie. GBM1610.

Dans les trois domaines du vivant, les étapes de la réplication de l'ADN sont similaires même si les acteurs qui interviennent peuvent varier (Figure 6). Chez les archées, la réplication du chromosome circulaire s'effectue selon un système bactérien avec des machineries protéiques de type eucaryote.

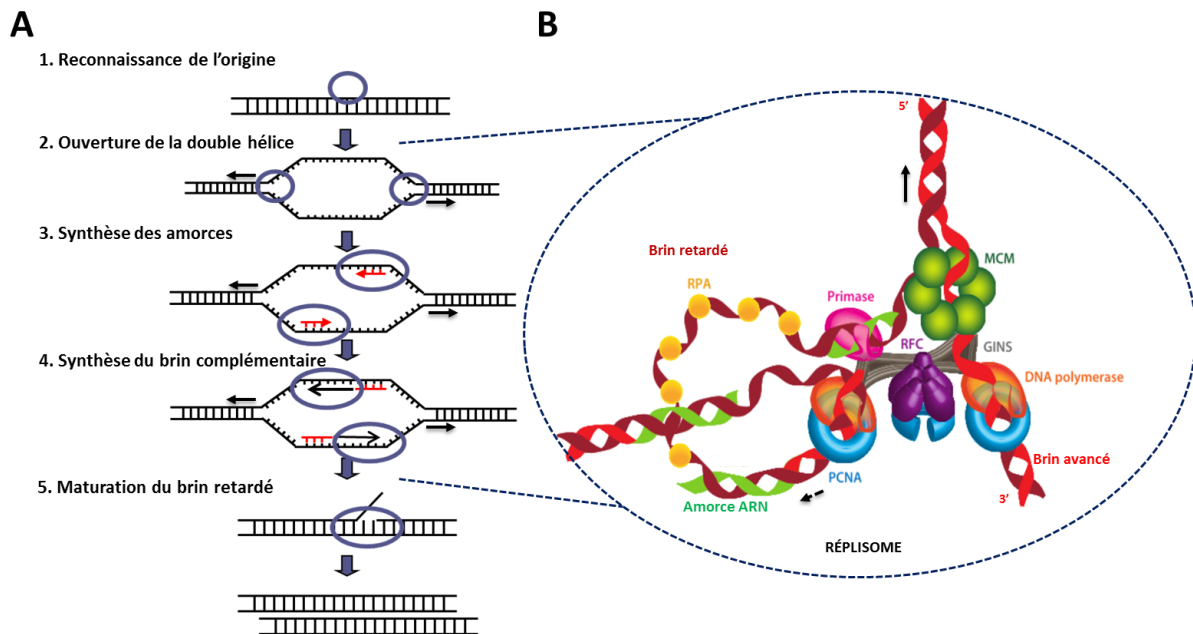
**1. Reconnaissance de l'origine de réplication:** la réplication peut avoir un ou plusieurs points de départ dans le chromosome appelés origines de réplication. Ces régions du chromosome sont repérées par les protéines Cdc6 et Orc1, qui viennent se fixer pour permettre ensuite de recruter l'hélicase répllicative, MCM et ainsi former le complexe de pré-réplication.

**2. Ouverture de la double hélice:** des protéines telles que les Gins s'ajoutent pour former un complexe de pré-initiation qui va dérouler la double hélice. Des protéines de fixation à l'ADN simple brin, RPA, se lient à l'ADN déroulé en vue de le protéger. Ce complexe est complété entre autres par la primase et l'ADN polymérase pour amorcer la réplication bidirectionnelle.

**3. Synthèse des amorces:** la synthèse du brin complémentaire est initiée par la création d'une courte amorce ARN. Les archées n'ont pas d'équivalent à la Pol $\alpha$  des eucaryotes, en revanche des primases archéennes auraient une fonction homologue de synthèse d'amorce d'ARN et d'ADN *in vitro* (Liu et al, 2001). Cette amorce fournit une extrémité 3' requise par l'ADN polymérase pour démarrer son activité de synthèse.

**4. Synthèse du brin complémentaire :** l'amorce est élonguée par l'action des ADN polymérases qui incorporent un à un les nucléotides complémentaires. L'ADN polymérase B des archées possède l'activité de synthèse 5'→3' commune à ces enzymes puis une fonction de relecture grâce à l'activité exonucléase 3'→5' plus spécifique aux archées. La polymérase D interviendrait dans la synthèse du brin retardé (Henneke et al, 2005). Le facteur de processivité de l'ADN polymérase, PCNA est chargé au niveau de l'amorce par le facteur RFC. La polymérase travaillant uniquement de 5'→3', l'un des deux brins de l'ADN, dit le brin retardé va être synthétisé par fragments, les fragments d'Okazaki.

**5. Maturation du brin retardé** : les fragments d'Okazaki sont reliés par une ligase après clivage de l'amorce ARN par une endonucléase FEN-1 ou après sa dégradation par une ribonucléase RNase HII (Henneke, 2012)



**Figure 6. Processus de la Réplication de l'ADN**

(A) Représentation schématique des étapes de la réplication de l'ADN. (B) Illustration du réplisome à la fourche de réplication d'après Kelman & Kelman, 2014. Les composants du réplisome sont détaillés dans le Tableau 3 avec le même code de couleur entre les protéines.

En listant les protéines impliquées dans ce procédé pour les bactéries, archées et eucaryotes (Tableau 3) on peut constater que les archées bien qu'ayant un chromosome circulaire, partagent de nombreuses homologues avec la machinerie protéique eucaryote. Toutefois des divergences se retrouvent au sein d'un même domaine entre les ordres Crenarchaeota et Euryarchaeota. Par exemple la protéine de fixation à l'ADN simple brin partage des similitudes avec le SSB bactérien chez les Crenarchaeota tandis que la protéine des Euryarchaeota est considérée comme homologue au RPA eucaryote. Ces divergences au sein même d'un domaine ne sont pas rares, et Raymann *et al.*, en a établi une liste, avec la répartition des protéines de la réplication entre les 142 génomes d'archées séquencés (Raymann et al, 2014).

Au cours de cette étude nous reviendrons en détails sur deux acteurs majeurs de ce processus: le facteur de processivité PCNA (Chapitre 1) et l'hélicase réplivative MCM (Chapitre 2).

*Que se passe-t-il en cas de dommage au niveau de la fourche de réplication ?*



**Tableau 3. Résumé des protéines impliquées dans la Réplication de l'ADN pour les trois domaines du vivant. D'après Kelman & Kelman, 2014.**

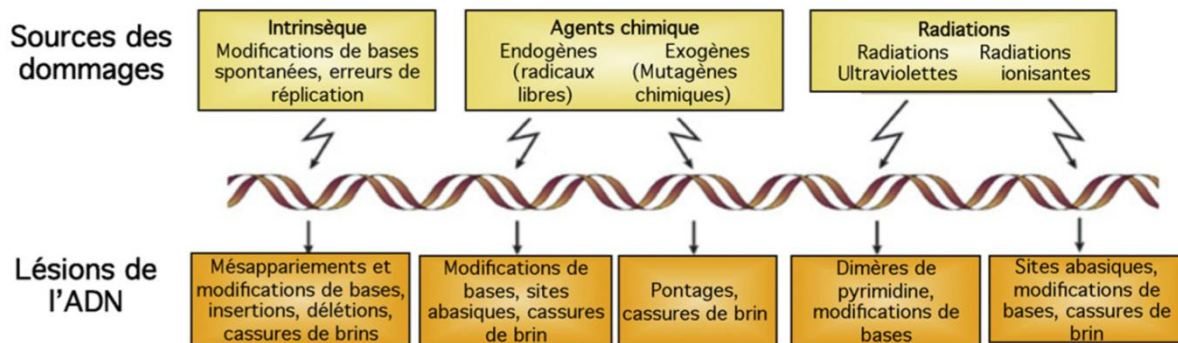
Les protéines en code couleur sont également représentée en Figure 6.B au niveau de la fourche de réplication. Le terme anglais *sliding clamp* qui signifie la pince coulissante est utilisé pour désigner l'anneau de processivité des ADN polymérases. Les protéines d'archées encadrées en rouge ont été l'objet d'étude de cette thèse et seront plus particulièrement détaillées dans les chapitres concernés. L'astérisque signifie qu'une protéine homologue existe chez les eucaryotes mais n'est pas impliquée dans la réplication.

	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Eukarya</i>	
<b>Chromosome</b>	Circulaire	Circulaire	Linéaire	
<b>Origine de réplication</b>	Unique	Unique ou multiple	Multiple	
<b>Initiation</b>	<b>Reconnaissance de l'origine</b>	Dna A	Cdc6-Orc1	ORC (1), ORC (2-6), Cdc6
	<b>Chargement de l'hélicase</b>	Dna C	Cdc6-Orc1	Cdc6 Cdt1
	<b>Hélicase réplivative</b>	Dna B	<b>MCM</b>	<b>MCM (2-7)</b>
			GINS-51, GINS-23 GAN <sup>RecJ</sup>	GINS (Sld5, Psf1), GINS (Psf2, Psf3) Cdc45
<b>Elongation</b>	<b>Protéine de fixation à l'ADN simple brin</b>	SSB	SSB	*
	<b>Polymérase/exonucléase</b>	Pol III (Famille C)	<b>RPA1</b>	<b>RPA70, RPA34, RPA14</b>
			<b>Pol B (Famille B)</b>	<b>Pol δ, Pol ε (Famille B)</b>
	<b>Chargement du <i>sliding clamp</i></b>	complexe γ	<b>RFC-L, RFC-S</b>	<b>RFC-L, RFC-S (1-4)</b>
	<b>Protéine <i>sliding clamp</i></b>	β <i>clamp</i>	<b>PCNA</b>	<b>PCNA</b>
	<b>Primase</b>	Dna G	<b>Primase (PriS, PriL),</b> Dna G?	<b>Primase (PriS, PriL)</b>
			Sous unité β ADN polymérase α	
<b>Maturation (brin retardé)</b>	<b>Excision de l'amorce</b>	Rnase HI	Rnase HII	Rnase H2A, Rnase H2B, Rnase H2C
		DNA Pol I	FEN-1	FEN-1
			Dna2 ?	Dna2
	<b>Ligature</b>		Ligase ADN, ATP-dépendante	Ligase ADN, ATP-dépendante
Ligase ADN, NAD <sup>+</sup> -dépendante		Ligase ADN, NAD <sup>+</sup> -dépendante		

### 3. LA RECOMBINAISON POUR RÉPARER L'ADN ENDOMMAGÉ

#### a) LÉSIONS DE L'ADN ET RÉPARATION

Au sein des cellules, dans des conditions environnementales standards, l'ADN est soumis à des stress susceptibles de l'endommager. Ces facteurs peuvent venir de l'extérieur (agents chimiques, radiations) et de l'intérieur liés à des procédés cellulaires (stress oxydatif, erreur de réplication) (Figure 7).



**Figure 7. Synthèse des différentes lésions pouvant survenir sur l'ADN (Rass et al, 2012).**

Ces dommages peuvent enrayer la machinerie de réplication et stopper le processus laissant alors une structure d'ADN en forme de fourche, susceptible de se rompre, engendrant une cassure double brin, le dommage le plus délétère pour la cellule. C'est pourquoi, il est important que ces dommages soient pris en charge dès leurs apparitions. Suivant la nature de la lésion et la phase du cycle cellulaire, la cellule va adapter sa réponse et sélectionner le mécanisme de réparation approprié : recombinaison, excision de base (BER), excision de nucléotide (NER), réparation des mésappariements (MMR), synthèse trans-lésionnelle. Il existe tout un arsenal de protéines qui participe à ces voies de réparation parfois redondantes d'un mécanisme à l'autre.

Chez les archées hyperthermophiles, plusieurs protéines ont été identifiées pour intervenir dans des mécanismes tels que la recombinaison, le BER et la synthèse trans-lésionnelle (Shin et al, 2014). Étonnamment, il manquerait dans le génome des archées certaines séquences de protéines intervenant généralement dans les mécanismes clefs de réparation comme le NER (White, 2003) et le MMR.

Ceci laisse présager des voies alternatives de réparation qui pourraient être spécifique aux archées. A *contrario*, la voie de réparation des cassures double brin par recombinaison homologue semble être essentielle à certaines espèces d'archées.

## *b) LA RECOMBINAISON, TROIS MÉCANISMES*

Les cassures double brin (DSB, *Double Strand Break*) correspondent à une rupture des liaisons phosphodiester entre les acides nucléiques et donc à une rupture du squelette de la double hélice. Bien que ce type de lésions puisse survenir de différentes sources telles que des agents chimiques externes ou encore des radiations, une cause prédominante des DSBs est liée à des événements internes comme des erreurs de réplication (revue dans Mehta & Haber, 2014). La détection d'un tel dommage doit être rapide et sa réparation efficace pour préserver l'intégrité du génome (Costanzo et al, 2001).

Pour cela deux grands mécanismes de recombinaison entrent en compétition : la recombinaison homologue (HR), et la recombinaison non homologue aussi appelée ligature d'extrémités non homologues (NHEJ, Non Homologous End Joining). La recombinaison homologue va utiliser une séquence homologue (exemple, la chromatide sœur) pour restaurer l'information génétique perdue par la cassure (San Filippo et al, 2008). Tandis que la voie du NHEJ consiste à simplement relier les extrémités d'ADN grâce à des ligases. Un troisième mécanisme a été mis à jour et serait une alternative au NHEJ d'où son nom : ligature d'extrémités non homologues alternative (A-NHEJ). Il utilise des homologies de séquence comme le HR mais bien plus courtes (Figure 8.C) (Rass et al, 2012)

Le mécanisme de HR est le plus complexe mais aussi le plus fidèle grâce à l'homologie de séquence employée pour réparer le dommage. C'est une voie de réparation qui a été conservée à travers l'évolution des trois domaines du vivant. La recombinaison homologue est initiée par la résection des extrémités d'ADN, l'un des deux brins est dégradé par des nucléases pour produire un long simple brin 3' (Figure 8.A). Cette extrémité protubérante est fixée par des recombinases qui se lancent dans la recherche d'homologie par une invasion de la chromatide sœur. Les brins complémentaires sont synthétisés et l'échange des brins entraîne la formation d'une jonction de Holliday, une structure complexe qui nécessite l'intervention des résolvases pour rétablir les deux ADN double brin. Les brèches générées sont comblées par les ligases.

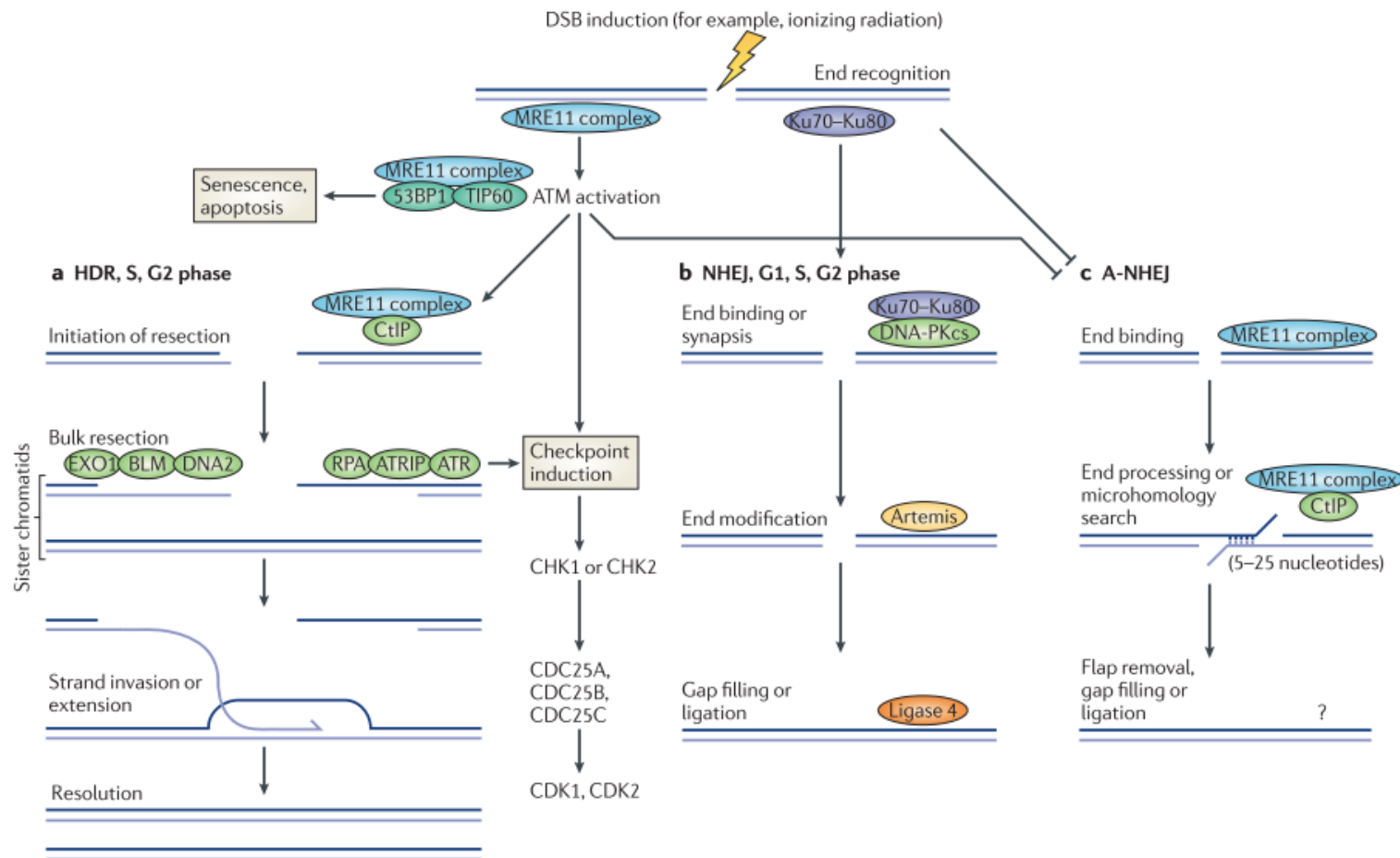
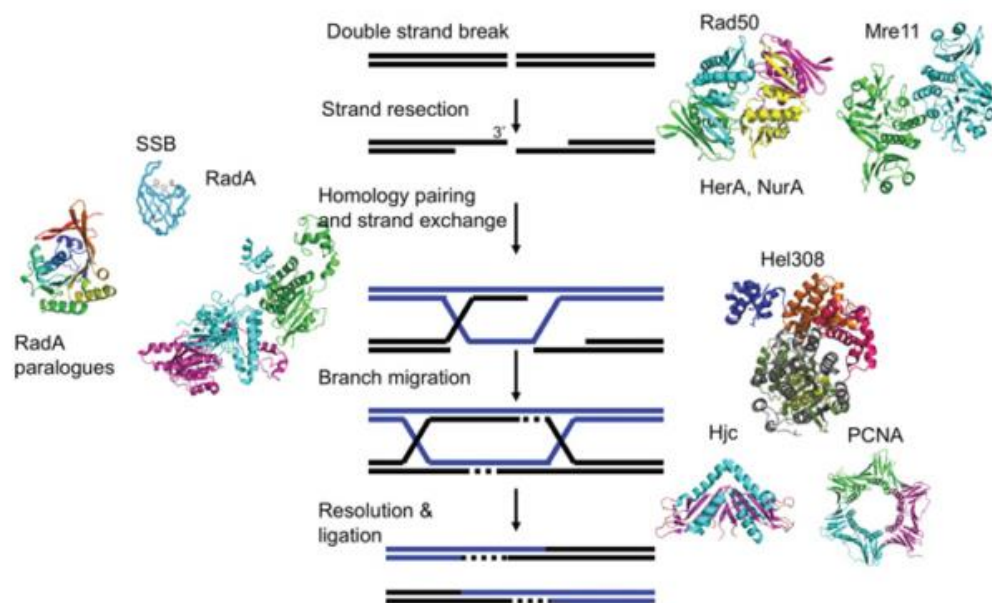


Figure 8. Trois voies de réparation des cassures double brin chez les eucaryotes : la recombinaison homologue (a), la ligature d'extrémités non homologues (b) et la ligature d'extrémité non homologues alternative (c) (Stracker & Petrini, 2011).

Chez les archées, tous les éléments protéiques qui catalysent la recombinaison homologue sont présents (Figure 9). Le complexe qui initie la résection des extrémités Mre11-Rad50, ainsi que la recombinase RadA sont des homologues aux protéines eucaryotes du système HR. Le couple nucléase/hélicase NurA-HerA ainsi que la resolvase Hjc sont spécifiques aux archées et même aux archées hyperthermophiles en ce qui concerne NurA-HerA (Constantinesco et al, 2004 ;Hopkins & Paull, 2008). Nous aurons l'occasion d'aller dans les détails de l'étape de résection des extrémités à travers l'étude du complexe Mre11-Rad50 (Chapitre 1).



**Figure 9. Présence des acteurs de la recombinaison homologue chez les archées (White, 2011).**

Résection des extrémités par Mre11-Rad50, NurA-HerA pour générer un long simple brin d'extrémité 3'. Les protéines SSB puis RadA se fixent à l'ADN simple brin et permettent la migration du brin et son échange au niveau d'une séquence homologue formant une jonction de Holliday. La migration de la jonction peut être catalysée par Hel308, une hélicase interagissant avec la resolvase Hjc, elle-même en interaction avec PCNA.

Pour ce qui est de la voie de réparation du NHEJ, l'action des protéines de liaison Ku combinée à l'ADN ligase, Lig 4 chez les eucaryotes et LigD chez les bactéries (Shuman & Glickman, 2007), permet de relier les extrémités d'ADN (Figure 9.B). Pendant longtemps, l'absence d'homologue aux protéines Ku et de ligase spécialisée suggérait l'absence de ce mécanisme chez les archées. En 2013, Bartlett *et al.* sont parvenus à reconstituer cette voie de réparation en associant une ligase, une polymérase, une phosphoesterase aux protéines Ku de l'archée mésophile *Methanocella paludicola*, une machinerie plus proche du mécanisme bactérien qu'eucaryote (Bartlett et al, 2013).

Chez certaines archées, dont on a pu étudier la génétique grâce à des mutants, les gènes des protéines de la recombinaison *mre11*, *rad50*, *radA*, ainsi que *nurA* et *herA* se sont révélés comme essentiels

(Tableau 4). Ayant été uniquement observé chez des archées hyperthermophiles, cela appuie l'importance de cette voie de réparation chez ces organismes de l'extrême.

**Tableau 4. Délétion des gènes de la recombinaison chez des archées hyperthermophiles. D'après Grogan, 2015.**

Gène	Activité / Fonction	Organisme	Phénotype	Référence
<i>herA</i>	Hélicase, résection DSBs	<i>T. kodakarensis</i> <i>S. islandicus</i>	Létale	Fujikane et al, 2010 Huang et al, 2015
<i>hjc</i>	Résolvase des jonctions d'Holliday	<i>T. kodakarensis</i> <i>S. islandicus</i>	pas d'impact	Fujikane et al, 2010 Zhang et al, 2013
<i>hje</i>	Résolvase des jonctions d'Holliday	<i>S. islandicus</i>	pas d'impact	Zhang et al, 2013
<i>hje+hjc</i>	Résolvase des jonctions d'Holliday	<i>S. islandicus</i>	létale	Huang et al, 2015
<i>hjm/hel308</i>	Hélicase, résection DSBs	<i>T. kodakarensis</i> <i>S. islandicus</i>	sensible à la mitomycine C létale	Dorazi et al, 2007; Huang et al, 2015
<i>mre11</i>	Nucléase, résection DSBs	<i>T. kodakarensis</i> <i>S. islandicus</i>	létale	Fujikane et al, 2010; Zhang et al, 2013 Huang et al, 2015
<i>nurA</i>	Nucléase, résection DSBs	<i>T. kodakarensis</i> <i>S. islandicus</i>	létale	Fujikane et al, 2010; Zhang et al, 2013, Huang et al, 2015
<i>rad50</i>	ATPase, résection DSBs	<i>T. kodakarensis</i> <i>S. islandicus</i>	létale	Fujikane et al, 2010; Zhang et al, 2013, Huang et al, 2015
<i>radA</i>	Recombinase	<i>T. kodakarensis</i> <i>S. islandicus</i>	létale	Fujikane et al, 2010; Zhang et al, 2013

Au jour d'aujourd'hui, tous les acteurs des processus de la maintenance du génome n'ont pas encore été identifiés et quant à ceux qui le sont déjà, de nombreuses interrogations subsistent. Chez les archées, les avancées dans la connaissance sur ces mécanismes proviennent en général d'études structure/fonction *in vitro* où il manque encore des analyses génétiques pour aller plus loin dans la définition des voies métaboliques impliquées. Une des alternatives, en attendant le développement d'outils génétiques pour la complémentation, est de caractériser le paysage des interactions des acteurs connus, ceci pour mieux cerner leurs fonctions et tenter de détecter de nouveaux intervenants.

### III. DE L'INTERACTION À LA FONCTION

« *Dis moi avec qui tu interagis, je te dirais qui tu es ...* »

Julien Briffotiaux, 2008, Thèse.

#### 1. RÉSEAU D'INTERACTION DE LA MAINTENANCE GÉNOMIQUE

Une des stratégies pour étudier les mécanismes moléculaires est de s'intéresser aux relations établies entre les protéines. En effet, si deux protéines interagissent ensemble, il est probable qu'elles soient impliquées dans des fonctions cellulaires communes.

Pour des mécanismes, comme ceux de la maintenance génomique, qui font appel à un arsenal de protéines, tous les acteurs ne sont probablement pas encore identifiés. Chez les archées plus particulièrement, plusieurs protéines clefs de certaines voies de réparation, pourtant conservées chez les bactéries et eucaryotes, manquent à l'appel. En utilisant un acteur protéique identifié comme appât, l'idée générale est d'analyser les autres protéines qui s'associent avec lui prouve qu'ils interagissent physiquement. En répétant l'opération avec différents appâts, il est possible de faire émerger un réseau d'interaction protéines-protéines. Certaines protéines sont de véritable plateforme d'interaction et constituent des nœuds au sein de ce réseau. À partir de ces nœuds il est possible de décerner des modules regroupant des protéines d'un même mécanisme.

Précédemment au laboratoire, une stratégie de co-immunoprécipitation couplée à l'identification des partenaires par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a révélé un réseau étendu des protéines impliquées dans la maintenance génomique chez l'archée hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* (Pluchon et al, 2013). Au cœur de ce réseau, la protéine en forme d'anneau, PCNA, constitue une plateforme dont les nombreuses interactions qui lui sont affiliées permettent aujourd'hui de construire un réseau dense où interviennent protéines de la réplication et de la réparation de l'ADN ainsi que de la transcription. Ces travaux ont permis de révéler des interactions avec des protéines qui n'étaient jusqu'alors non identifiées ainsi que des interactions inattendues entre des protéines déjà connues (Figure 10).





## 2. NOUVELLES INTERACTIONS, POUR QUELLE(S) FONCTION(S) ?

Deux nouvelles interactions ont été retenues pour être le sujet de cette thèse: (i) PCNA, *maestro* de la réplication, pourrait recruter le complexe Mre11/Rad50 (MR) lui-même impliqué dans le processus de réparation par recombinaison homologue. (ii) MCM, potentielle hélicase réplicative, interagirait avec XPD, une hélicase dont les homologues eucaryotes sont associés à la voie de réparation du NER.

Ces protéines sont toutes les quatre déjà bien connues et les fonctions de leurs homologues eucaryotes relativement bien étudiées. Pourtant c'est la première fois qu'une interaction physique est relevée entre ces protéines, que nous allons appeler partenaires potentiels. Dans le cas de PCNA/Mre11-Rad50, l'interaction a été visualisée séparément avec chacune des protéines recombinantes utilisées en appât pour piéger son partenaire dans l'extrait cellulaire de *P. abyssi*. Elle a été par ailleurs confirmée dans un essai de co-immunoprécipitation entre les protéines recombinantes uniquement et après l'ajout d'une nucléase pour éliminer les résidus éventuels d'ADN. Pour la seconde interaction, seule MCM a servi d'appât pour piéger XPD. De façon surprenante, le réseau ne révèle qu'un seul partenaire de MCM, alors que cette hélicase réplicative est impliquée dans le réplisome avec de nombreux partenaires fonctionnels. Son interaction avec XPD en est d'autant plus intéressante que cette hélicase était attendue dans le module des protéines du NER. Ces interactions soulèvent donc de nouvelles d'interrogation.

L'objectif pour moi était de caractériser plus précisément ces deux interactions protéines-protéines pour proposer un rôle physiologique à ce partenariat dans la maintenance génomique des archées. Dans un premier temps, j'ai mené une approche fonctionnelle centrée sur les activités enzymatiques de chacune des protéines pour en déterminer les changements en présence du partenaire potentiel. Cette approche a ensuite été complétée par des techniques de biophysiques.

Ainsi deux chapitres composent cette thèse, un par interaction étudiée : (i) PCNA/Mre11-Rad50 et (ii) MCM/XPD. Chacun démarre avec une présentation détaillée des protéines pour en appréhender les caractéristiques physiques et biochimiques avant de s'intéresser aux expériences menées et aux résultats obtenus qui sont discutés dans le chapitre concerné. Une conclusion générale de l'ensemble des travaux clôture ce manuscrit.



# CHAPITRE I: PCNA/MRE11-RAD50

---

## *De la Réplication à la Recombinaison*

### **Plan de l'étude :**

#### I. Présentation des protéines

##### 1. PCNA

##### 2. Mre11-Rad50

##### 3. Objectif de l'étude

#### II. Résultats

##### 1. Protéines

##### 2. Apprivoiser les activités nucléases de *PfuMR*

##### 3. Quand le complexe MR rencontre PCNA

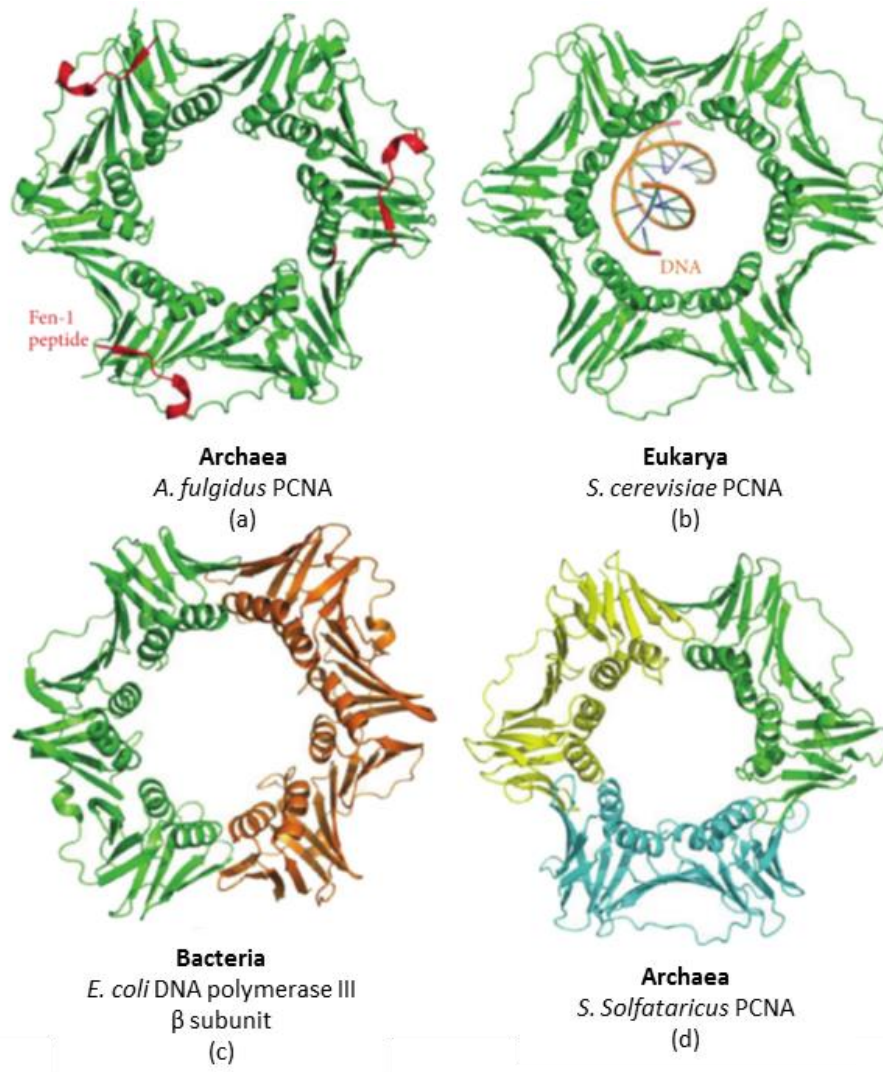
#### III. Article : interaction *PfuPCNA/PfuMR*

#### IV. Informations supplémentaires

##### 1. Matériels et méthodes

##### 2. Résultats

#### V. Discussion et perspectives



**Figure 11. Représentation de la diversité structurale du PCNA dans les trois domaines du vivant (Shin et al, 2014).**

Comparaison des assemblages de PCNA. PCNA est organisé en un trimère composé de trois unités identiques chez la plupart des archées et eucaryotes. **(a)** PCNA de l'Archaea *A. fulgidus* avec en interaction un peptide de Fen-1 à chaque unité (code PDB 1RXZ). **(b)** PCNA de la levure *S. cerevisiae*, également un homotrimer (code PDB 3K4X). **(c)** l'équivalent du PCNA chez la bactérie *E. coli* est organisé en homodimère (code PDB 2POL). **(d)** Exception parmi les archées où chez les Crenarchaeota PCNA est composé de différentes unités, trois unités dans le cas *S. solfataricus* (code PDB 2HIK).

## I. PRÉSENTATION DES PROTÉINES

### 1. PCNA

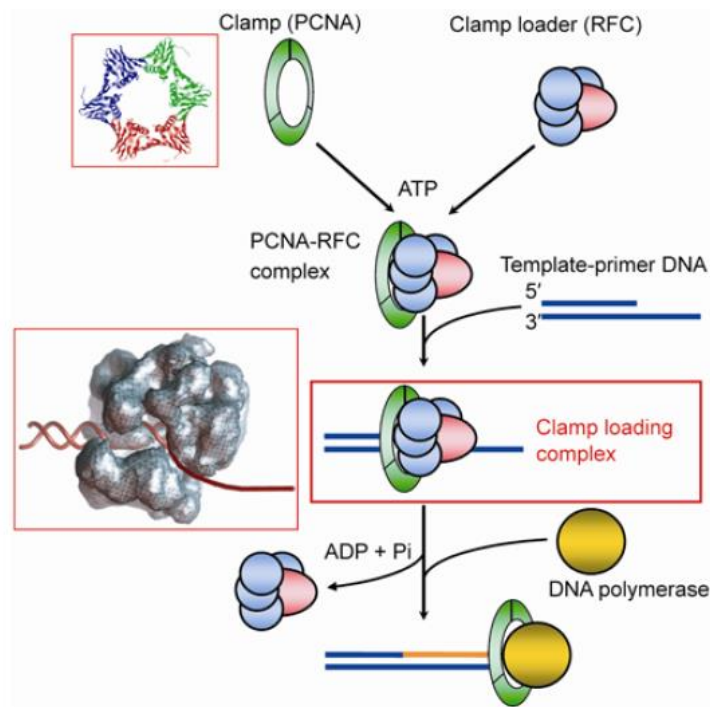
#### a) DES PROCARYOTES AUX EUCARYOTES

PCNA de son nom complet *Proliferating Cell Nuclear Antigen* appartient à la famille des *sliding clamp* (« pince coulissante »).

Des procaryotes aux eucaryotes en passant par certains virus, PCNA est une protéine dont la structure et la fonction ont été généralement conservées à travers l'évolution (Figure 11). Une unité de PCNA est composée de deux domaines en position N et C-terminal séparés par une région flexible, l'IDCL (Interacting Domain Connecting Loop). Cette protéine s'assemble pour former un anneau en raccordant le domaine C-terminal d'une unité au domaine N-terminal de l'unité suivante. Chez les eucaryotes et le bactériophage T4 trois unités identiques s'assemblent pour former un homotrimère, tandis que l'équivalent structural du PCNA chez les bactéries se présente en homodimère. Chez les archées, plusieurs formes subsistent, les euryarchées telle que *P. abyssi* ont une seule copie de PCNA complexée en homotrimère (exception faite de *Thermococcus kodakarensis*, Pan et al, 2013), alors que les Crenarchées possèdent plusieurs homologues du PCNA formant des hétérotrimères (Bell, 2009). Malgré ces disparités, le complexe PCNA présente une pseudosymétrie conservée dans les trois domaines du vivant, elle est caractéristique des *sliding clamp* et est en étroite relation avec leur fonction au sein de la maintenance génomique.

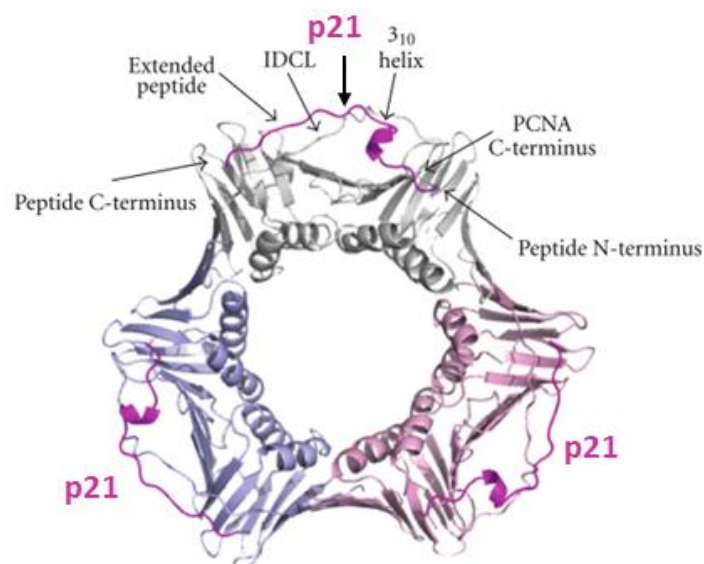
#### b) UN ANNEAU POUR ENCERCLER L'ADN

L'espace central de l'anneau a un diamètre suffisamment large pour faire passer de l'ADN double brin. Dépourvu d'activités enzymatiques, PCNA est une protéine venant se fixer sur l'ADN et plus spécifiquement aux jonctions ADN simple brin / ADN double brin. Pour encercler l'ADN, PCNA sollicite « généralement » son facteur de chargement attiré, RFC (*Replication Factor C*) qui par son activité ATPase permettrait d'ouvrir l'anneau pour y introduire le brin d'ADN au centre comme indiqué dans le schéma Figure 12. « Généralement », car il a été démontré chez certaines archées que PCNA pouvait se fixer sur l'ADN de lui-même, même si RFC renforce sa fixation (Cann et al, 1999 ; Henneke et al, 2002 ; Rouillon et al, 2007).



**Figure 12. Illustration du chargement du PCNA sur un substrat ADN type matrice/amorce (Ishino & Ishino, 2012).**

RFC et PCNA interagissent, l'hydrolyse de l'ATP par RFC permet d'ouvrir la structure du PCNA pour laisser pénétrer les brins d'ADN au centre de l'anneau. L'ADN polymérase vient interagir avec PCNA et libère par la même occasion RFC. Illustrées à gauche, la structure cristallographique de *Pyrococcus furiosus* PCNA (code PDB : 1GE8) ainsi que la structure ternaire du complexe formé par RFC/PCNA/ADN.



**Figure 13. Interaction du PCNA humain avec le peptide p21 (Winter & Bunting, 2012).**

Le peptide interagit au niveau du site de fixation du PIP-motif positionné entre la partie C-terminale du PCNA et l'IDCL. Chaque monomère de PCNA est coloré distinctement, et le peptide p21 est en magenta. Code PDB : 1AXC.

### c) UNE PLATEFORME DE RECRUTEMENT

Cet anneau intervient au cœur même des processus de la maintenance génomique, son implication la mieux connue se situe au niveau de la fourche de réplication où il agit tel un véritable *maestro* pour coordonner ce processus de duplication de l'ADN. PCNA n'a pas d'activité enzymatique à proprement parler, mais il recrute les différents acteurs des processus qui synthétisent, relie ou encore clivent l'ADN. En 2007, Moldovan *et al.* recensaient déjà plus d'une soixantaine de protéines interagissant avec PCNA comprenant des ADN polymérases, des ligases, des nucléases, des hélicases, ou encore des kinases (Moldovan *et al.*, 2007). Parmi les archées, le réseau du PCNA s'étend également des protéines de la réplication jusqu'à des acteurs de processus de réparation. Même des protéines virales interagissent avec le PCNA présent chez leur hôte comme cela semble être le cas avec le virus SIRV2 infectant l'archée hyperthermophile *S. islandicus* (Gardner *et al.*, 2014).

#### ✦ Un ou des motifs d'interaction

Pour beaucoup de ces interactions, les liaisons avec PCNA s'établissent *via* la zone correspondant à une séquence protéique spécifique relativement conservée à travers les espèces, appelée PIP-motif (*PCNA Interacting Protein*). Identifié en 1996 par Gulbis *et al.* dans la région C-terminale de la protéine humaine p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, ce motif a été généralisé pour se présenter ainsi: Q-x-x- $\Phi$ -x-x- $\Omega$ - $\Omega$ , où «  $\Phi$  » représente un résidu hydrophobe tel que la Leucine (L), Isoleucine (I) ou la Méthionine (M) tandis que «  $\Omega$  » définit un résidu aromatique comme la Tyrosine (Y), la Phénylalanine (F) ou le Tryptophane (W) et « x » tout type d'acide aminé (Warbrick, 1998).

Dans leur article, Gulbis *et al.* ont détaillé l'implication des différents résidus dans l'établissement de liaison à l'interface du PCNA (Gulbis *et al.*, 1996). Comme illustré dans la Figure 13, le peptide p21 présentant ce PIP-motif interagit entre la partie C-terminale du PCNA et l'IDCL. La glutamine (Q) est un résidu généralement conservé du PIP-motif qui est dit canonique, elle établit des liaisons à la surface du PCNA *via* des molécules de solvant. La structure secondaire de ce peptide présente une hélice de type  $3_{10}$  qui s'insère avec quelques résidus de son voisinage C-terminal dans la poche hydrophobe à la surface du PCNA. En aval de cette hélice, la partie appelée *extended peptide* interagit avec l'IDCL.

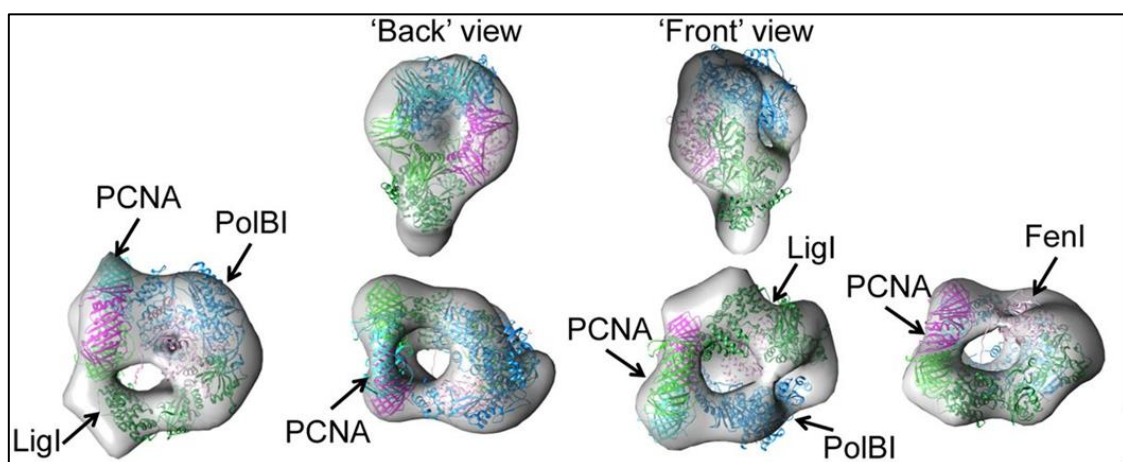
Depuis sa publication, ce motif a été utilisé par plusieurs équipes pour rechercher de nouveaux partenaires du PCNA y compris chez les archées où ce motif est largement conservé (Warbrick, 2000 ; Meslet-Cladiere *et al.*, 2007). Cependant au fil des recherches, de nouveaux partenaires du PCNA ont été identifiés bien que ne possédant pas le PIP-motif. Ainsi des dérivés de ce motif ont émergé. En scannant une librairie de peptides aléatoires, Xu *et al.* ont révélé qu'un second groupe de peptides présentant un motif consensus différent du PIP-motif interagissait avec PCNA. Cet autre motif, appelé KA motif a été, entre autres, identifié dans l'ADN polymérase  $\delta$  comme second site d'interaction au PCNA (Xu *et al.*, 2001).

En 2009, Gilljam *et al.* ont révélé l'APIM motif (Alk B homolog 2 PCNA Interacting Motif) identifié dans la protéine humaine Alk B homolog 2 se présentant ainsi : K/R-F/Y/W-[L/I/V/A]<sub>x2</sub>-K/R (Gilljam 2009). Récemment, il a été découvert que la protéine XPA, impliquée dans la voie de réparation du NER, interagissait avec PCNA; elle présente le motif nouvellement identifié l'APIM (Gilljam et al, 2012). Depuis, il a aussi été démontré que la flexibilité de l'interface d'interaction du PCNA autorisait la fixation de partenaires présentant l'arrangement de la séquence du PIP-motif inversé (exemple de la protéine Akt : **FFAGIVWQ**) (Pedley et al, 2014).

#### ✦ Régulation des interactions

En voyant la liste des partenaires du PCNA s'allonger, une question essentielle s'est posée sur l'orchestration de ces interactions. Toutes ces protéines ne peuvent venir se fixer au PCNA en même temps, il doit y avoir naturellement des mécanismes pour réguler les entrées sur la plateforme. Mailand *et al.* en résumant les principes clés dans une revue où les modifications post-traductionnelles du PCNA, décrites par Ulrich et Takahashi, y jouent un rôle essentiel (Mailand et al, 2013; Ulrich & Takahashi, 2013). Des procédés tels que l'ubiquitylation du PCNA chez les eucaryotes, génèrent de nouveaux ports d'attache aux protéines. Cette modification post-traductionnelle est retrouvée chez les archées (Eichler & Adams, 2005), il est probable qu'un tel procédé soit également à l'œuvre pour réguler les interactions du PCNA.

Chez l'archée *Sulfolobus solfataricus*, l'hétérogénéité des unités de PCNA permet à l'anneau de lier distinctement trois partenaires, Fen1, ligase et ADN polymérase (Figure 14) impliqués dans la maturation des fragments d'Okazaki (Cannone et al, 2014).



**Figure 14. Modèle 3D de l'assemblage du complexe PCNA-PolB1-Fen1-Lig1-ADN impliqué dans la maturation des fragments d'Okazaki de *Sulfolobus solfataricus* (Cannone et al, 2014).**

Modélisation à partir du complexe visualisé en cryomicroscopie électronique et de la superposition des structures individuelles de chaque protéine. Les trois partenaires viennent se lier à chaque unité du trimère de PCNA.



En parallèle, Dovrat *et al.*, démontrent *in vitro* que pour ces même partenaires, mais cette fois-ci chez les eucaryotes, la fixation simultanée des partenaires du PCNA n'est pas nécessaire et qu'elle peut se réaliser de manière séquentielle (Dovrat et al, 2014). Empêcher la trimérisation du PCNA pourrait également être un mécanisme de régulation des activités du PCNA. Li *et al.*, ont identifié chez l'archée *T. kodakarensis* un peptide se fixant au PCNA mais sans présenter de motif connu de type PIP-motif et empêchant la formation du trimère (Li et al, 2014). Même si la compréhension complète de ces processus de régulation nous fait encore défaut, les études démontrant le rôle du PCNA en tant que facteur de processivité pour ces partenaires se multiplient.

#### **d) UN FACTEUR DE PROCESSIVITÉ**

Surnommé le maestro de la réplication, PCNA orchestre ce processus non seulement en recrutant différents acteurs mais aussi en augmentant la processivité de certains de ses partenaires dont les ADN polymérase. Que ce soit lors de la réplication avec les ADN polymérase, ou sur les sites de dommages à l'ADN, PCNA favorise ou déclenche les réactions enzymatiques dans lesquelles sont impliqués ses collaborateurs (Tableau 5). Comme en témoignent les travaux de Chen *et al.*, le PCNA eucaryote est localisé au niveau des sites de cassures double brin lors d'une irradiation des cellules, et son interaction avec la nucléase Exo1 (PIP-motif présent dans sa séquence) est essentielle à l'efficacité de cette nucléase pour intervenir dans la résection des brins d'ADN et cela sans le facteur de chargement RFC (Chen et al, 2013). Ainsi en plus de son rôle à la fourche de réplication, PCNA participe aux processus de réparation de l'ADN et de recombinaison.

**Tableau 5. Partenaires du PCNA répertoriés chez les Archaea (Pan et al, 2011).**

L'asterix indique que l'effet du PCNA sur l'enzyme n'a été démontré que chez une espèce.

<b>Protéine</b>	<b>Effet</b>	<b>Organismes</b>
<b>PolB</b>	Processivité de la polymérase augmentée	<i>A. pernix</i> , <i>A. fulgidus</i> , <i>M. thermoautotrophicum</i> , <i>M. acetivorans</i> , <i>P. abyssi</i> , <i>P. furiosus</i> ; <i>S. solfataricus</i>
<b>PolD</b>	Processivité de la polymérase augmentée	<i>A. fulgidus</i> ; <i>P. abyssi</i> , <i>P. furiosus</i> , <i>P. horikoshii</i> ,
<b>PolY</b>	Processivité de la polymérase augmentée	<i>M. acetivorans</i> , <i>S. solfataricus</i>
<b>RFC</b>	Chargement du PCNA sur l'ADN	<i>A. pernix</i> , <i>A. fulgidus</i> , <i>M. thermoautotrophicus</i> , <i>P. abyssi</i> , <i>P. furiosus</i> , <i>S. solfataricus</i>
<b>ADN ligase</b>	Activité ligase stimulée	<i>A. pernix</i> , <i>P. furiosus</i> , <i>S. solfataricus</i>
<b>Fen1</b>	Activité nucléase stimulée	<i>A. pernix</i> , <i>P. aerophilum</i> , <i>S. solfataricus</i>
<b>Rnase HII</b>		<i>A. fulgidus</i> , <i>P. abyssi</i>
<b>Rad2</b>		<i>A. fulgidus</i>
<b>UDG</b>	Activité stimulée*	<i>P. aerophilum</i> , <i>P. furiosus</i> *, <i>S. solfataricus</i>
<b>XPF</b>	Activité nucléase déclenchée	<i>S. solfataricus</i>
<b>AP</b>	Activité nucléase stimulée	<i>P. furiosus</i>
<b>NucS</b>	Spécificité du clivage augmentée	<i>P. abyssi</i>
<b>Hjc</b>	Activité nucléase stimulée	<i>S. solfataricus</i>
<b>Hel308<sup>Hjm</sup></b>	Activité hélicase stimulée	<i>P. furiosus</i>

## 2. MRE11-RAD50

Les cassures double brin sont nocives pour la cellule dans la mesure où elles peuvent générer un blocage de mécanismes cellulaires telle que la réplication, ou provoquer une perte d'informations génétiques. Si elles ne sont pas réparées, c'est la survie de la cellule qui est compromise, mais ce type de lésion est aussi à l'origine d'aberrations chromosomiques et d'une instabilité génomique se traduisant chez l'humain notamment par des cancers.

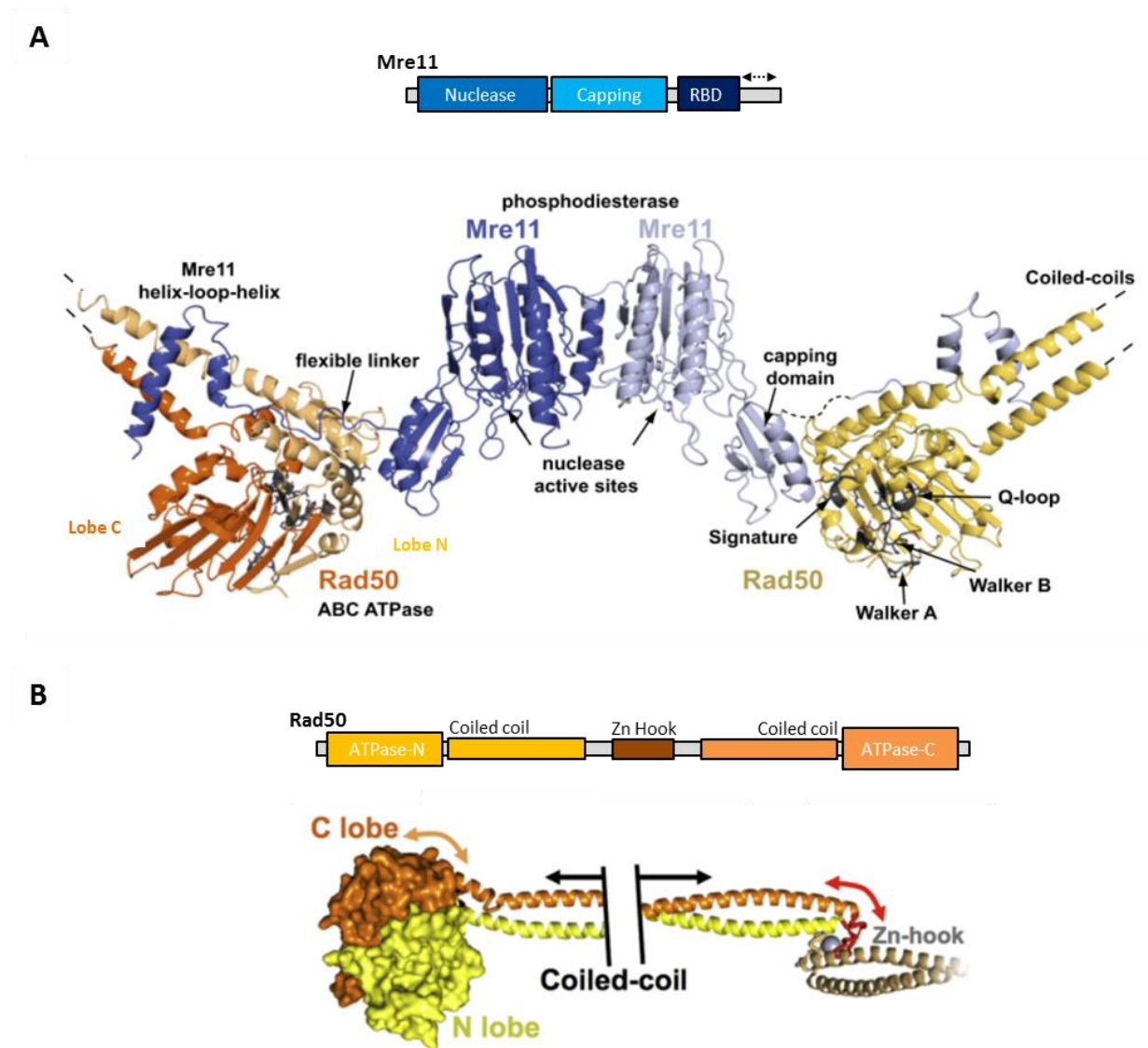
Comme abordé précédemment, le complexe Mre11-Rad50 est appelé à avoir un rôle primordial dans les voies de réparation des cassures double-brin.

### a) DES PROCARYOTES AUX EUCARYOTES

Le complexe Mre11-Rad50 est un assemblage macromoléculaire dont les principales caractéristiques structurales et catalytiques sont représentées dans les trois domaines du vivant et chez certains virus, suggérant ainsi une implication biologique conservée à travers l'évolution. Toutefois, leur importance physiologique diffère suivant les domaines et parfois au sein d'un même phylum. Le complexe MR est composé de Mre11 (*Meiotic recombination 11*) et de Rad50 (*Radiation sensitive*) chez les eucaryotes (Paull & Gellert, 1998) et archées (Hopfner et al, 2000a), il a été dénommé SbcD (M) - SbcC (R) parmi les bactéries (Naom et al, 1989) ou encore gp47 (M) - gp46 (R) pour le phage T4 (Blinov et al, 1989). Il y a toutefois une particularité propre aux eucaryotes: MR est complexé avec une troisième protéine, Nbs1 chez les mammifères (MRN, Paull & Gellert, 1999) ou Xrs2 chez la levure (MRX, Ivanov et al, 1992), dont les homologues n'ont pas été identifiés parmi les bactéries ni chez les archées.

Chez les eucaryotes, l'importance du complexe MRX/N n'est plus à démontrer étant donné que la délétion des gènes *mre11* et *rad50* abouti à la mort d'embryons de souris, ou augmente l'hypersensibilité aux dommages de l'ADN chez les levures et les cellules de mammifères (Huertas, 2010). S'il n'est pas totalement opérationnel, les défauts du complexe engendrent chez les humains des maladies telles que l'*Ataxia-Telangiectasia-Like Disorder* (A-TLD, mutation dans Mre11), le *Nijmegen Breakage Syndrome-like Disorder* (NBSLB, mutations dans Rad50 ou Mre11) (Limbo et al, 2012; Regal et al, 2013). Contrairement à son homologue eucaryote, le complexe bactérien SbcD/C n'aurait qu'un rôle secondaire, et n'interviendrait sur l'ADN qu'en cas d'absence du complexe RecBCD, une machinerie protéique alliant hélicase et nucléase (Eykelboom et al, 2008).

Chez les archées, le rôle du complexe MR reste ambigu. Des homologues à Mre11 et Rad50 ont bien été identifiés dans les différents génomes d'archées examinés jusqu'à aujourd'hui. Mais alors que la délétion des gènes *mre11* et *rad50* est possible chez une halophile telle que *Haloferax volcanii* augmentant légèrement sa sensibilité aux radiations (Delmas et al, 2013), elle n'est pas permise chez les archées hyperthermophiles *Thermococcus kodakarensis*, *Sulfolobus islandicus* (Fujikane et al, 2010; Zhang et al, 2013) suggérant une fonction essentielle.



**Figure 15. Représentations graphiques du complexe Mre11-Rad50.**

(A) Représentation schématique de l'organisation des domaines de Mre11. La flèche noire indique une région désordonnée située en C-terminal. En dessous, structure du tétramère Mre11-Rad50 de la bactérie *Thermotoga maritima* (Lammens et al, 2011). Les pointillés au niveau des *coiled-coils* de Rad50 illustrent la région centrale qui a été tronquée pour la résolution structurale (3QG5 pour le complexe Mre11-Rad50<sup>NBD</sup>, 3QF7 pour le complexe Mre11<sup>HLH</sup>:Rad50<sup>NBD</sup>:AMPPNP).

(B) Schéma de la structure de Rad50 (Lafrance-Vanasse et al, 2015). En jaune et orange, Rad50 avec ses lobes C et N-terminaux formant le domaine ATPase, le tout relié par une chaîne spiralee (*coiled-coil*). La région centrale de Rad50 constitue un crochet de zinc. Les flèches illustrent les régions flexibles.

## ***b) UNE CONFORMATION STRUCTURALE DYNAMIQUE***

Les gènes codant pour Mre11 et Rad50 sont positionnés dans le même opéron, et naturellement *in vivo* c'est un complexe hétérotétramérique ( $M_2R_2$ ) qui se forme, composé de deux sous-unités Mre11 et de deux sous-unités Rad50. Ces dix dernières années ont vu les efforts s'accroître pour appréhender la structure et la dynamique de ce complexe et ainsi tenter d'expliquer son implication dans les processus biologiques (revue Lafrance-Vanasse et al, 2015). Les protéines d'archées hyperthermophiles telles que *Pyrococcus furiosus*, *Methanococcus jannaschii* ou encore de la bactérie thermophile *Thermotoga maritima*, se sont avérées particulièrement utiles pour résoudre la structure de leur homologue eucaryote tout en analysant l'architecture de ce complexe sous tous ses angles.

### **✦ Organisation structurale des unités Mre11 et Rad50**

Bien que l'enzyme **Mre11** soit composée de 708 acides aminés chez l'humain contre 426 chez l'archée *P. furiosus*, leur structure comprend dans les deux modules (Figure 15.A), centre des opérations de l'activité nucléase : le *core* domaine situé en N-terminal de la protéine qui contient les motifs phosphoesterases formant le site catalytique et le *capping* domaine rattaché au domaine précédent qui est supposé discriminer l'ADN simple brin de l'ADN double brin (Das et al, 2010; Williams et al, 2008). Au sein du site actif de Mre11, sept résidus conservés sont impliqués dans la coordination de deux ions métalliques  $Mn^{2+}$  importants pour son activité nucléase. L'enzyme est également capable de fixer un seul ion  $Mg^{2+}$  avec toutefois une affinité plus faible (Hopfner et al, 2001). La partie C-terminale de Mre11 est constituée d'une région flexible qui relie le «capping» domaine au domaine de fixation à Rad50 (RBD, *Rad50 binding domain*). Ce domaine de fixation est primordial pour l'interaction de Mre11 avec Rad50, la mutation de quelques résidus de ce domaine suffi à entraîner une perturbation majeure de la formation du complexe *in vivo* (Williams et al, 2011). Puis vient l'extrémité C-terminale de Mre11, celle-ci est désordonnée limitant la résolution de sa structure avec le reste de la protéine, mais serait une région de contact avec l'ADN ou encore d'autres protéines et serait sujette à des modifications post-traductionnelles (Boisvert et al, 2005 ; Dery et al, 2008).

La structure de **Rad50** est atypique : une longue chaîne spiralée reliant les deux domaines N-ter et C-ter siège de l'activité ATPase (Figure 15.B). La « tête » de cette enzyme est constituée par les domaines ABC-ATPase répartis à chaque extrémité, le motif Walker A de fixation de l'ATP en N-ter et le motif Walker B ainsi que des motifs signatures caractéristiques de cette famille d'ATPases. Relativement large comparée à Mre11 (Rad50 : 1312 résidus chez l'humain contre 882 pour *P. furiosus*), la structure spiralée appelée *coiled-coil* allonge la protéine humaine sur près de 500 Å (Hopfner et al, 2000b). La dimérisation de Rad50 s'opère par la fixation de deux molécules d'ATP en présence d'ion magnésium  $Mg^{2+}$  selon une conformation « tête-queue ». La partie de la tête en N-ter de Rad50 se lie au domaine ATPase en C-ter de l'autre unité Rad50 et vice-versa, ceci reconstitue deux sites actifs pour l'hydrolyse de l'ATP. En parallèle, les chaînes spiralées de Rad50 se rejoignent

formant un pont flexible d'environ 1000 Å en interagissant par l'intermédiaire de la région centrale de Rad50 : un crochet de zinc (motif : CXXC) constitué de cystéines conservées qui à quatre coordonnent un ion  $Zn^{2+}$  (de Jager et al, 2001; Hopfner et al, 2002).

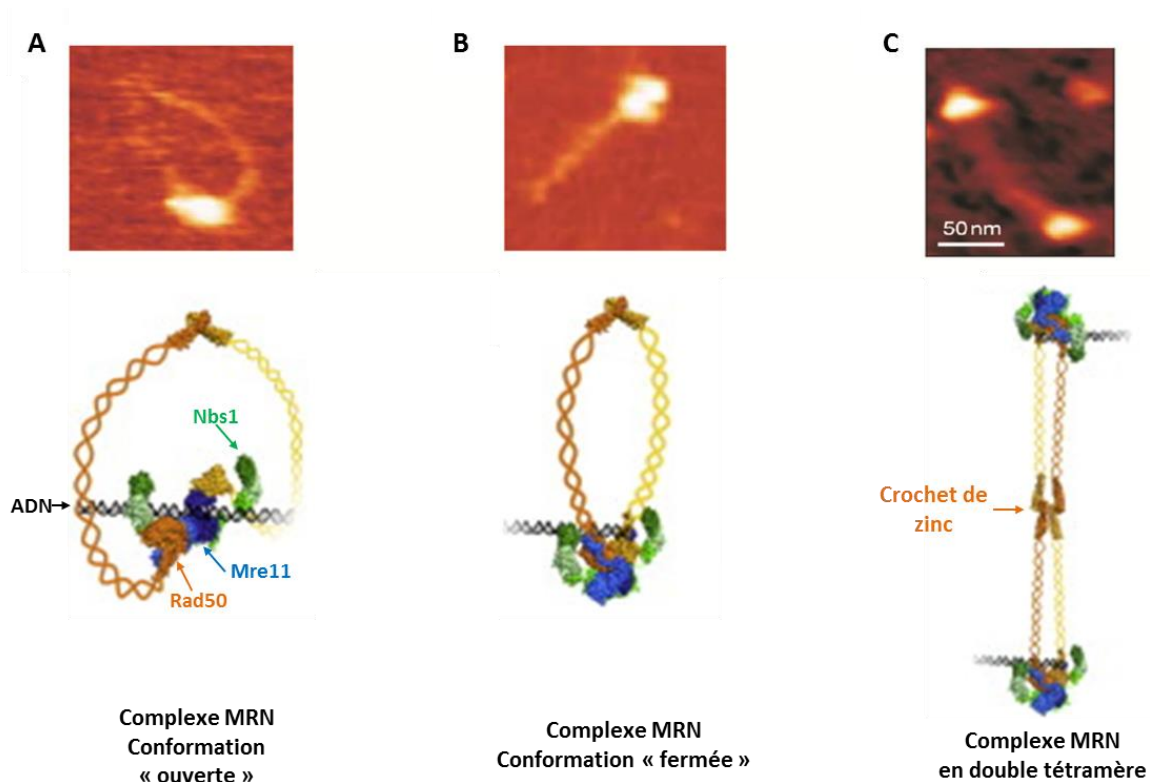
Des études sur des mutants au niveau du doigt de zinc ou avec des parties réduites de *coiled-coil* nous informent sur un phénomène d'allostérie (long-range allostery) par lequel le motif influencerait l'orientation des domaines ATPase de Rad50 et donc sur l'orientation globale du complexe MR (Hohl et al, 2015). Comme illustré sur la structure cristallographique (Figure 15.A), c'est à la base des *coiled-coils* de Rad50 que vient se fixer le domaine RBD de Mre11. Cette interface d'interaction est primordiale pour la formation du complexe MR même si d'autres zones de contact sont probables (Williams et al, 2011).

#### ✦ **Mre11-Rad50, un complexe dynamique**

Il a été par ailleurs clairement démontré que ce complexe MR avait une dynamique propre entre ses différentes unités. En solution et en absence d'ATP, le complexe MR de *P. furiosus* adopte majoritairement une conformation ouverte ou partiellement ouverte (Williams et al, 2011) avec les domaines nucléases de Mre11 au centre et les deux unités de Rad50 en périphérie. La flexibilité de la partie C-terminale de Mre11 jusqu'au RBD permet de large changement conformationnel. L'ensemble de la machinerie MR peut adopter un état dit « ouvert » ou « fermé » (Figure 16). Nous reviendrons sur cette singularité tout au long de ce chapitre puisqu'elle est à l'origine d'une régulation des activités catalytiques de Mre11 et de Rad50 ainsi que de la fixation du complexe sur diverses structures ADN.

#### **c) CHARGEMENT SUR L'ADN**

L'analyse structurale du dimère Mre11 chez *P. furiosus* montre que le complexe MR se charge sur l'ADN *via* l'établissement de liaisons entre le squelette de sucre-phosphate de l'ADN et les deux domaines N-terminaux de Mre11 expliquant ainsi l'absence de spécificité pour une séquence ADN donnée (Williams et al, 2008). Un sillon est formé par la dimérisation de la protéine pouvant accueillir l'ADN<sub>db</sub> entre les deux domaines nucléases tandis qu'une poche de fixation de l'ADN<sub>sb</sub> se révèle sur le côté du site actif de Mre11. Séparément chacune des enzymes Rad50 et Mre11 peut se fixer à l'ADN, cependant la dimérisation et l'interaction des deux partenaires renforcent considérablement la stabilité du complexe MR/ADN (Hopfner et al, 2000b). Observé en microscopie électronique (Hopfner et al, 2002) et AFM (Moreno-Herrero et al, 2005), le complexe MR peut également adopter une configuration en hétéro-octamère ( $M_2R_2$ )<sub>2</sub> où chaque tétramère est fixé à un brin d'ADN où le contact entre les complexes s'établit au niveau des doigts de zinc de Rad50 (Figure 16.C). Cette configuration serait assimilée à un pont entre les brins d'ADN et aurait un rôle structural durant le processus de recombinaison.



**Figure 16. Le complexe humain Mre11-Rad50-Nbs1 adoptant plusieurs conformations.**

(A) Complexe MRN sous sa forme ouverte, (B) lié à un brin d'ADN en conformation fermée, (C) lié de part et d'autre de l'ADN les deux tétramères se raccrochant mutuellement par le doigt de zinc de Rad50. Les images supérieures ont été prises par AFM (Atomic Force Microscopy) (Moreno-Herrero et al, 2005) tandis que les schémas de l'état conformationnel du complexe MRN lié à l'ADN sont issus de Lafrance-Vanasse et al, 2015.

#### d) ACTIVITÉS CATALYTIQUES DES ENZYMES

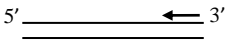

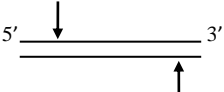
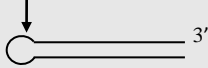
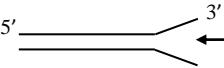
##### ✦ Activités nucléases de Mre11

De la famille des phosphoesterases, l'enzyme Mre11 est capable de couper la liaison phosphodiester reliant deux bases de l'ADN, ce qui lui vaut d'être classifiée sous un terme plus général de nucléase. *In vitro*, des analyses biochimiques sur les complexes bactériens SbcDC, ceux du phage T4 (gp46/47), archéens MR, de levure MRX et humain MRN ont révélé quatre activités de clivage de l'ADN (Tableau 6) : clivage endonucléolytique de l'ADN simple brin (ADNsb), activité exonucléase orientée de 3' en 5' et une activité endonucléase sur de l'ADN double brin (ADNdb), ouverture de structure ADN type « épingle ». *In vitro*, les activités du complexe dépendent de la présence d'ATP et de manganèse, cation qui ne peut être remplacé de manière efficace par un autre ion divalent tels que  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Co^{2+}$  à des exceptions près chez *P. furiosus* dont nous discuterons dans la partie « Résultats ».

Ajouté à ces activités de dégradation de l'ADN, Mre11 en complexe avec Rad50 est capable de dérouler une extrémité d'ADN double brin grâce à la fixation des molécules d'ATP par Rad50.

**Tableau 6. Activités enzymatiques du complexe MR et de ses homologues sur l'ADN simple et double brin.**

SbcCD (bactérie), gp46/47 (phage T4), MR (archée), MRX (levure), MRN (humain).

	Substrat ADN	Co-facteurs	Complexe MR	Références
<b>Résection de l'ADN</b>				
3'→5' exonucléase		+ ATP Mn <sup>2+</sup>	SbcCD, gp46/47, MR, MRX, MRN	Connelly et al, 1999; Herdendorf et al, 2011; Hopfner et al, 2000a; Trujillo & Sung, 2001; Trujillo et al, 1998
Endonucléase ADNsb		- ATP Mn <sup>2+</sup>	SbcCD, gp46/47, MR, MRX, MRN	Connelly et al, 1999; Herdendorf et al, 2011; Hopkins & Paull, 2008; Trujillo & Sung, 2001; Trujillo et al, 1998
Endonucléase ADNdb		+ ATP Mn <sup>2+</sup> ou Mg <sup>2+</sup> *	SbcCD, gp46/47, MR, MRX, MRN	Cannavo & Cejka, 2014; Herdendorf et al, 2011; Hopkins & Paull, 2008; Lim et al, 2015
Ouverture des structures ADN type « épingle »		+ ATP	SbcCD, MR, MRX, MRN	Connelly et al, 1998; Paull & Gellert, 1998; Trujillo & Sung, 2001
<b>Déroutement de l'ADN</b>		+ ATP, Mg <sup>2+</sup>	MRN	Cannon et al, 2013; Lee & Paull, 2005; Paull & Gellert, 1999

\* Seul Hopkins & Paull, 2008 ont révélé cette activité endonucléase du complexe MR sur de l'ADN double brin en présence de Mg<sup>2+</sup> et d'ATP.

#### ✦ Activité ATPase de Rad50

La fixation des deux molécules d'ATP génère la dimérisation de Rad50 masquant ainsi les sites nucléases de Mre11 dans une conformation dite « fermée ou ATP-lié » où seule l'hydrolyse de l'ATP en ADP permet de rouvrir ce complexe et d'effectuer l'action de coupure de l'ADN (Lim et al, 2011; Mockel et al, 2012; Paull & Deshpande, 2014). Ce cycle de fixation et d'hydrolyse de l'ATP est nécessaire à l'action répétée de dégradation des extrémités suggérant un rôle dans la translocation du complexe sur l'ADN. Toutefois, le taux d'hydrolyse de l'ATP par Rad50 du bactériophage T4 est relativement faible ( $k_{cat} = 0,15 \text{ s}^{-1}$ ) mais la présence de Mre11 et de l'ADNdb stimulerait cette activité par une activation allostérique augmentant ainsi de 20 fois ce taux (Herdendorf et al, 2011). Suivant les organismes, le complexe montre des taux d'hydrolyse différents *in vitro*. Ainsi les complexes eucaryotes tournent à un faible taux d'hydrolyse avec 0,03 à 0,1 mol d'ATP hydrolysé par mole de protéine par minute (Bhaskara et al, 2007; de Jager et al, 2002), comparé au complexe gp46/47,

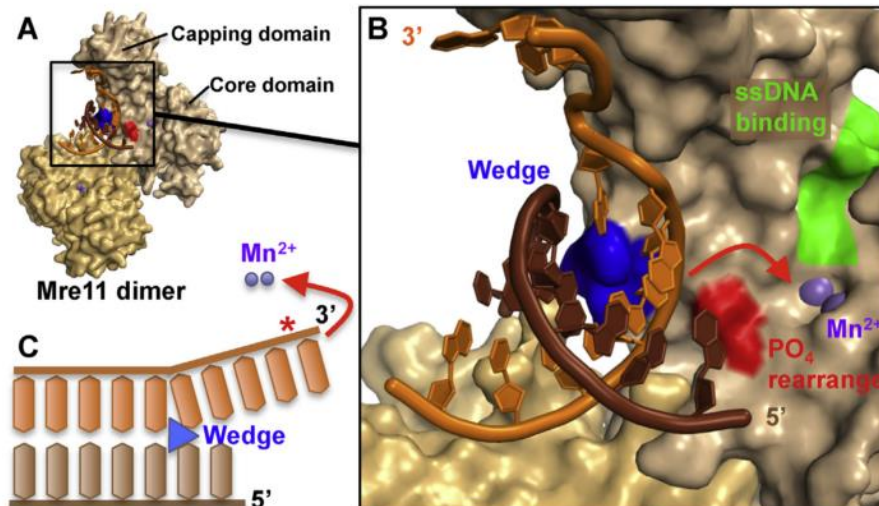


SbcCD, ou le complexe MR d'archée dont le taux d'hydrolyse est de 1 à 4 moles par minutes (Deshpande et al, 2014; Herdendorf et al, 2011; Lammens et al, 2011; Majka et al, 2011). Pour autant l'affinité du complexe pour l'ATP est de l'ordre du micromolaire, et il semblerait que le complexe maintienne une conformation fermée sur un laps de temps relativement long (Herdendorf & Nelson, 2014).

En plus de son activité ATPase, Rad50 catalyse la réaction de type adénylate kinase en transférant un phosphate de l'ATP à l'AMP pour générer deux molécules d'ADP. Démontrée *in vitro* avec les complexes MR de *P. furiosus*, *S. cerevisiae* et *H. sapiens*, cette réaction peut être initiée par l'hydrolyse de l'ATP suivie par la réaction inverse d'adénylate kinase (Bhaskara et al, 2007). Le rôle physiologique de cette activité est encore mal connu car contrairement à l'hydrolyse de l'ATP, cette autre activité n'aurait pas d'effet sur le changement conformationnel du complexe MR (Deshpande et al, 2014).

#### ✦ **Mre11-Rad50, un contrôle des activités**

Bien que ces deux unités aient des activités enzymatiques bien distinctes, leur coopération dans la formation du complexe permet une régulation des activités nucléases et ATPases de MR tout en lui conférant une compétence supplémentaire. Chez les eucaryotes, le complexe MRN se fixe à la cassure double brin et déroule l'extrémité sur 15 à 20 paires de base (Cannon et al, 2013). Ce mode opératoire bien que suspecté dans des études antérieures (Paull & Gellert, 1999), a été visualisé par Cannon *et al.* grâce à une méthode de FRET sur molécule unique démontrant la capacité du complexe MRN à maintenir une structure d'ADN ouverte sur plusieurs minutes *in vitro*. Ce déroulement local de l'ADN s'opère suivant une rotation du dimère Mre11 qui permettrait de « tordre » le squelette de la double hélice d'ADN. Le brin d'ADN contraint est dirigé *via* une histidine conservée dans le site actif de Mre11 pour subir l'activité exonucléase 3'→5' (Figure 17). La mutation de cette histidine (His52, *P. furiosus* ; His63 human) provoque une perte de cette activité exonucléase sans pour autant perturber l'activité endo de Mre11 laissant supposer des mécanismes différents (Williams et al, 2008). Ceci s'appuie également sur la présence d'une interface d'interaction à l'ADN simple brin sur le côté du site actif (Figure 17.B), l'ADN simple brin étant plus flexible l'histidine ne serait pas nécessaire à sa rotation.



**Figure 17. Déroulement local de l'extrémité d'ADN double brin par Mre11 (Tsutakawa et al, 2014).**

(A) Le dimère de Mre11 interagit avec l'hélice d'ADN par ses domaines *capping domain* et *core domain* (code PDB 3DSD). (B) Région du site actif à l'interface du dimère de Mre11. Une torsion de la double hélice est provoquée par le contact de l'ADN avec deux régions de Mre11 (en bleu et rouge) et permet de diriger le brin susceptible d'être clivé (en orange) au niveau du site actif contenant les ions Mn<sup>2+</sup> (en mauve). Une autre porte d'entrée pour l'ADN simple brin se situe sur le côté de Mre11 à proximité du site actif (en vert). (C) Schématisation de l'ouverture du double brin provoqué par le réarrangement du phosphate (en rouge) pour diriger l'extrémité 3' vers le site actif.

#### ✦ Xrs2/Nbs1 : le troisième partenaire eucaryote

Pour réguler ses différentes activités catalytiques, le complexe eucaryote MRX/N dispose de la troisième unité Xrs2 ou Nbs1. Cette protéine additionnelle ne dispose pas d'activité enzymatique, mais joue un rôle multifonctionnel : stabilisation du complexe MRN/MRX sur l'ADN, contrôle les activités nucléases et ATPases ainsi que le déroulement des extrémités d'ADN (Paull & Gellert, 1999). Les analyses *in vivo* de mutants ont révélé son rôle de médiateur dans des interactions avec différents partenaires et dans la localisation du complexe dans le noyau de cellule de mammifère (Paull & Deshpande, 2014). Mais le rôle de Nbs1 ne s'arrêterait pas au processus impliquant le complexe MRN, il interviendrait indépendamment du complexe dans la réponse à différents dommages de l'ADN telle que la synthèse translésionnelle (revue de Saito & Komatsu, 2015).

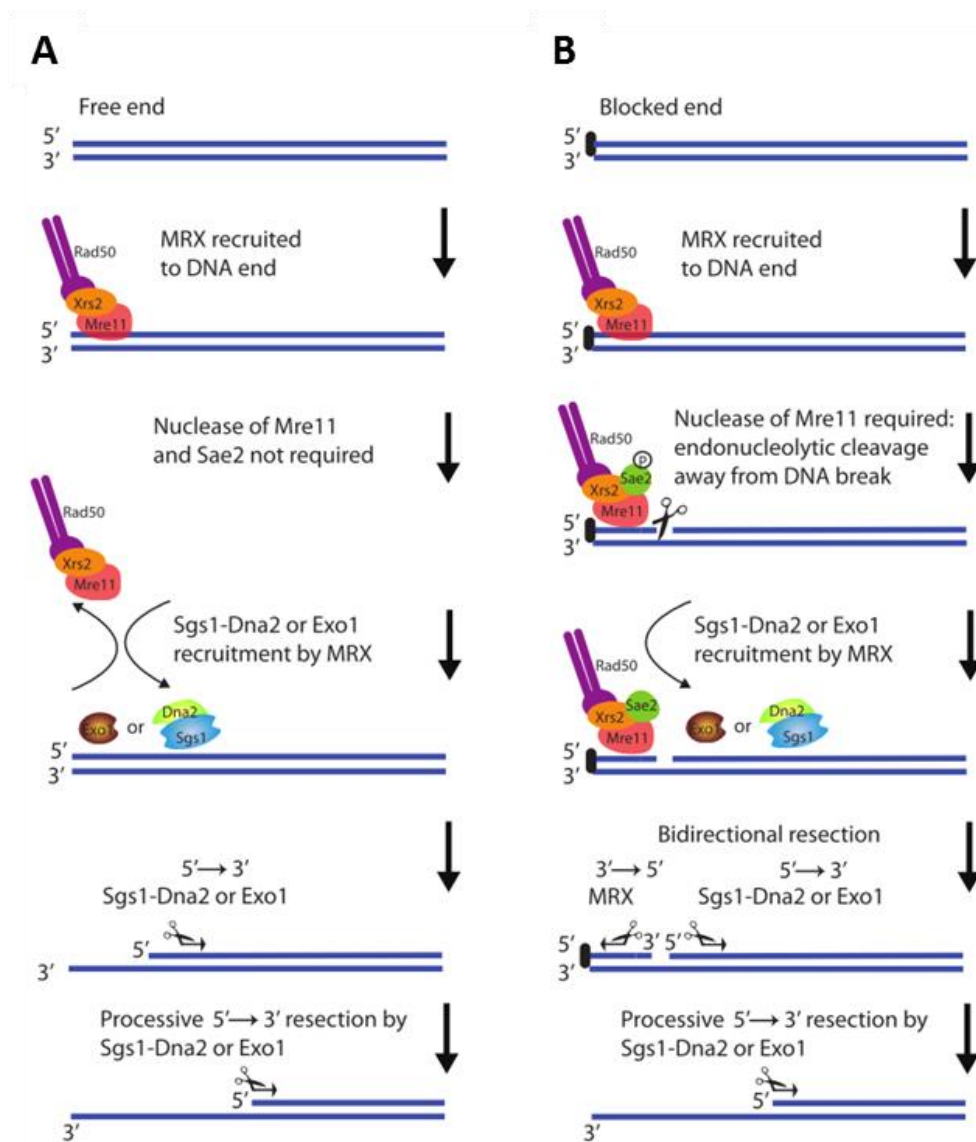
### e) RÔLES PHYSIOLOGIQUES

Le complexe MR est un élément clef du processus de réparation des cassures double brin par recombinaison. En cas de cassure, il est l'un des premiers agents à intervenir sur les lieux de la lésion (Lisby et al, 2004; Shroff et al, 2004) où il joue un rôle essentiel dans la détection, la stabilisation et la signalisation des cassures ainsi que dans la mise en place des acteurs pour le processus de recombinaison. Comme nous l'avons abordé dans l'introduction générale, il existe plusieurs processus de réparation des DSBs: la recombinaison homologue (HR), la recombinaison non-homologue (NHEJ) et la recombinaison non homologue alternative (A-NHEJ). Pour initier les processus HR et A-NHEJ, une résection simple brin de l'ADN est requise.

#### ✦ Résection des extrémités d'ADN

Avant d'opérer le processus de recombinaison, les extrémités d'ADN sont préparées à l'échange des brins, et c'est le complexe MR qui initie cette étape de résection des extrémités. Durant longtemps la polarité 3'→5' pour l'activité exonucléase de Mre11 paraissait en contradiction avec la génération de simple brin 3' sortant requis pour la recombinaison homologue. De récentes études menées chez les eucaryotes ont révélé un mécanisme en deux étapes pour une résection bidirectionnelle (Figure 18).

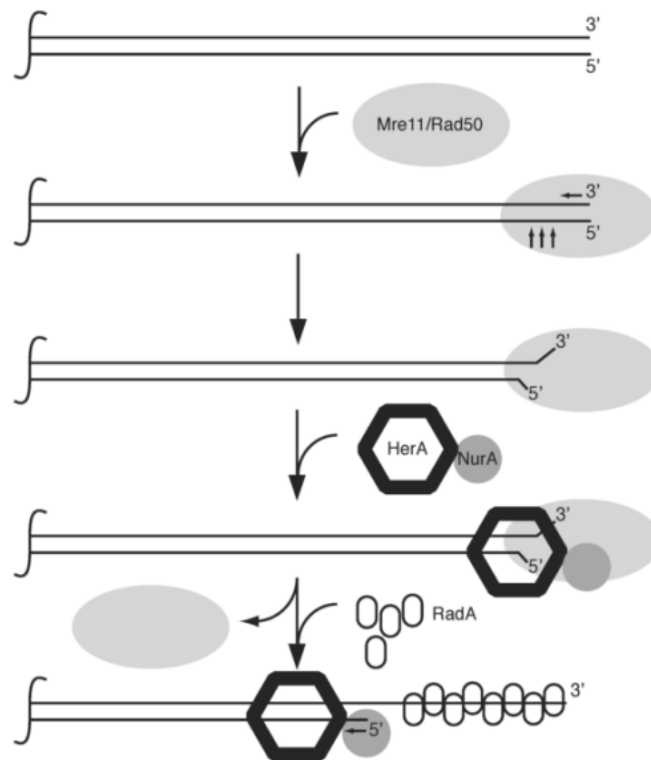
Une première étape fait intervenir le complexe MRX et la protéine Sae2 chez la levure pour une résection limitée au niveau de l'extrémité 5'. À cette extrémité des adduits protéiques peuvent se lier covalamment, c'est le cas de la topoisomérase Spo11 durant la méiose chez la levure (Garcia et al, 2011; Keeney et al, 1997) ou des protéines Ku pendant la mitose (Dobbs et al, 2010). Pour désencombrer cette extrémité, l'activité endonucléase du complexe MRX est stimulée par Sae2 (Cannavo & Cejka, 2014). L'incision dans le simple brin serait ensuite étendue selon une résection bidirectionnelle par l'activité exonucléase 3'→5' du complexe MR et dans la direction opposée par Exo1 ou par le couple nucléase/hélicase formé par Dna2/Sgs1. La coopération des protéines du complexe MRX et Sae2 permet d'éliminer quelques dizaines de nucléotides de l'extrémité de la cassure double brin tandis que Exo1, Dna2/Sgs1 réalisent une résection plus processive générant la production d'un simple brin 3' suffisamment long pour opérer l'échange de brin homologue. Cette résection du brin 5' pourrait aller jusqu'à 3,5 kb dans des cellules humaines (Zhou et al, 2013). *In vivo* l'activité endonucléase de Mre11 est critique pour initier la résection et promouvoir le processus de recombinaison homologue (Shibata et al, 2013). Si elle échoue, absence de Mre11 ou Exo1/Dna2-Sgs1, la voie de réparation bascule vers un processus plus mutagène, la ligature des extrémités non homologues (NHEJ ou A-NHEJ).



**Figure 18. Modèle de résection initié par le complexe MRX chez la levure (Cejka, 2015).**

(A) Cas d'une extrémité double brin libre où les activités nucléases de MRX ne sont pas requises. Les enzymes Exo1 ou le couple Sgs1/Dna2 étendent la résection dans la direction 5'→3'. (B) Modèle de résection bidirectionnelle dans le cas d'une extrémité double brin bloquée covalamment en 5'. La protéine Sae2 phosphorylée (en vert) stimule le clivage endonucléolytique opéré par le complexe MRX. La résection est étendue dans la direction 5'→3' par Exo1 ou Sgs1/Dna2 tandis que le complexe MRX poursuit la dégradation dans le sens opposé 3'→5'.

En ce qui concerne les archées, le modèle reste encore à éclaircir. Un homologue à la protéine eucaryote Spo11 a été identifié dans le groupe d'ADN topoisomérase VI chez les archées (Bergerat et al, 1997). Ceci suggère que le complexe MR aurait également à cliver l'extrémité 5' covalemment liée. Chez *P. furiosus*, le complexe MR est capable de générer des extrémités simple brin 3' sortant de 15 à 55 nt (Hopkins & Paull, 2008). Pour ensuite étendre la résection, le couple nucléase/hélicase formé par NurA/HerA est un excellent candidat et pourrait jouer un rôle similaire aux protéines eucaryotes Exo1, Dna2/Sgs1. Chez les archées hyperthermophiles, les gènes de ces deux protéines sont codés dans le même opéron que *mre11* et *rad50* à la fois chez des Crenarchaeota dont *Sulfolobus acidocaldarius* (Constantinesco et al, 2004) et des Euryarchaeota comme *Pyrococcus furiosus* (Hopkins & Paull, 2008).



**Figure 19. Coopération du couple nucléase/hélicase NurA-HerA avec le complexe MR chez *P. furiosus* pour initier la recombinaison homologue (Hopkins & Paull, 2008).**

Le complexe MR initie la résection de l'extrémité double brin permettant le chargement de NurA-HerA qui étend la dégradation du brin 5' pour générer un long simple brin 3' sortant fixé par la recombinase RadA.

Plus récemment leurs homologues ont été identifiés chez la bactérie radio-résistante, *Deinococcus radiodurans* où leur absence provoquerait une prolifération cellulaire anormale et réduirait l'efficacité de la recombinaison intermoléculaire (Cheng et al, 2015). HerA possède une activité hélicase bidirectionnelle dépendante de l'ATP dont la résolution structurale a révélé une organisation en hexamère dirigeant la translocation du complexe NurA<sub>2</sub>HerA<sub>6</sub> le long de l'ADN double-brin

(Blackwood et al, 2012). En interaction étroite avec HerA, la nucléase NurA est capable de processor l'ADN à la sortie de HerA en le déroulant et le dégradant. NurA est une endonuclease ADN simple brin et exonuclease 5'→3' ADN simple et double brin répondant ainsi de manière complémentaire à l'action 3'→5' de Mre11 (Blackwood et al, 2012; Chae et al, 2012; Constantinesco et al, 2002; Hopkins & Paull, 2008). La récente résolution structurale de HerA suggère que le double brin d'ADN est toujours encerclé par NurA-HerA (Rzechorzek et al, 2015) et en cas d'extrémité simple brin 3' sortant, celui-ci trouverait un pore alternatif de sortie du complexe sans passer par le site actif de NurA (Byrne et al, 2014).

De façon intéressante la coopérativité du complexe MR avec le couple NurA-HerA *in vitro* permet de produire un simple brin sortant utilisable par RadA pour catalyser l'échange de brin chez *P. furiosus* (Figure 19). Toutefois aucune interaction physique entre le complexe *Pfu*MR et les protéines *Pfu*HerA ou *Pfu*NurA n'a pu être révélée en contradiction avec l'interaction physique observée entre MR et HerA chez *S. acidocaldarius* (Quaiser et al, 2008). L'initiation de la résection par le complexe MR permet donc la production d'un substrat ADN utilisable par le couple HerA-NurA, toutefois la procédure de recrutement de ce partenaire reste à éclaircir.

#### ✦ Un renfort structural à la fourche de réplication

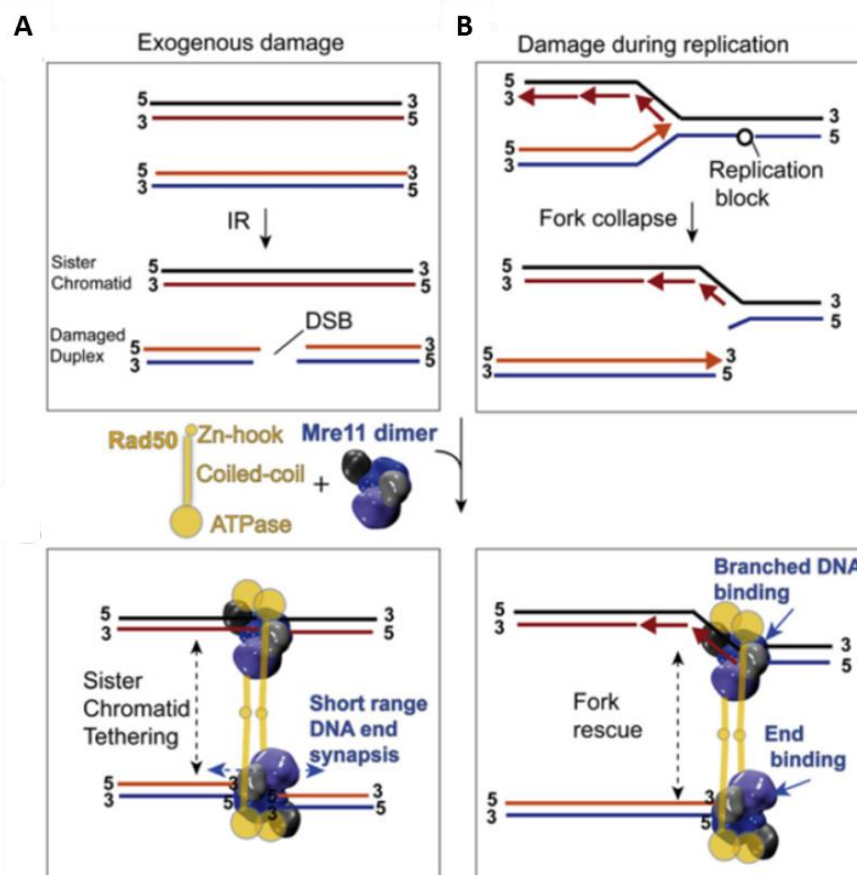
Indépendamment de sa fonction dans la recombinaison, le complexe MR s'implique dans le compactage et la réorganisation du nucléoïde (zone où le contenu génétique est disposé dans les cellules procaryotes). Chez *Haloferax volcanii*, le complexe MR favorise le rassemblement du nucléoïde en cas de stress cellulaire endommageant l'ADN ou interférant avec la réplication (Delmas et al, 2013). Ceci favoriserait l'intervention des acteurs de la réparation en créant une proximité et ainsi accélérerait le rétablissement de la cellule.

La fourche de réplication étant une zone où les risques de DSBs ne sont pas négligeables, il n'est pas surprenant de constater la présence du complexe clef de leur réparation. Ainsi Maser *et al.* ont visualisé, dans des cellules humaines, le complexe MRN à proximité des brins naissants d'ADN durant la phase S du cycle cellulaire. Cette co-localisation du complexe de la recombinaison et du PCNA sans contexte de stress cellulaire, laisse supposer une implication du complexe à la fourche de réplication (Maser et al, 2001).

Lors d'une rupture de la fourche de réplication, tous les acteurs de la réplication sont essentiels (excepté les protéines de pré-initiation) (Lydeard et al, 2010) mais ne suffisent pas à relancer la machinerie répliative. Chez les eucaryotes, lorsque le réplisome est démantelé, les acteurs de la recombinaison Rad51 et Mre11 sont vitaux pour autoriser le rechargement de ces éléments (Hashimoto et al, 2011). Ces résultats rejoignent ceux de Tittel-Elmer *et al.*, qui décrivent un blocage

de la réplication dans des conditions de stress pour l'ADN et une impossibilité pour les cellules de poursuivre cette réplication si le complexe MRX (complexe pour la levure) est altéré par des mutations. Ainsi la présence du complexe MRX/N participerait à la stabilisation des différents composants du réplisome et maintiendrait une cohésion entre les chromatides sœur lors d'une interruption de la fourche (Figure 20). Il est intéressant de constater que ceci est vrai même lorsque l'activité nucléase de Mre11 est abolie (Tittel-Elmer et al, 2009).

Dans un contexte similaire, le chargement de la cohésine au niveau de la fourche de réplication dépendrait de l'intégrité structurale de Rad50. Durant la réplication, la protéine cohésine maintient ensemble les néo-brins d'ADN de la chromatide. En cas de problème au niveau de la fourche cette fonction est cruciale pour en garantir le redémarrage (Tittel-Elmer et al, 2012). L'ensemble de ces données suggère un rôle structural du complexe MR à la fourche de réplication. D'après les observations de Maser *et al.*, citées précédemment le chargement du complexe s'effectuerait en prévention de DSBs. En tant que plateforme d'interaction, le PCNA serait un excellent candidat pour recruter le complexe MR sur une structure telle que la fourche de réplication.



**Figure 20. Rôle structural du complexe MR en cas de cassure double brin (A) ou de rupture de la fourche de réplication (B) (Williams et al, 2008).**

La configuration en double tétramère de MR maintient les brins à proximité pour favoriser la recombinaison homologue.

### 3. OBJECTIF DE L'ÉTUDE

Le complexe MR joue un rôle crucial dans de nombreux mécanismes de l'ADN et semble être un élément essentiel au développement des archées hyperthermophiles. La dynamique structurale de ce complexe en font une machinerie aux rôles multiples et donc difficile à appréhender dans son contexte physiologique. Son activité exonucléase qui paraissait initialement d'une importance majeure paraît aujourd'hui avoir un rôle secondaire comparé à son activité endonucléase (Williams et al, 2008). De plus, la liste des partenaires interagissant avec le complexe MR s'allonge, et cela dans les trois domaines du vivant et le phage T4, révélant ainsi des mécanismes de régulation complexes et parfois intriqués entre deux processus tels que la réplication et la recombinaison. En ajoutant le complexe MR aux partenaires du PCNA chez une Thermococcale (Pluchon et al, 2013), l'implication du PCNA dans le processus de recombinaison pourrait se confirmer chez les archées à moins qu'il ne s'agisse d'un recrutement du complexe MR à la fourche de réplication ou encore d'un tout autre mécanisme non défini.

Mon rôle a été d'investiguer cette interaction PCNA/MR par une approche fonctionnelle. Durant le processus de recombinaison, le complexe Mre11-Rad50 initie la résection des extrémités d'ADN grâce à une coordination de Mre11 (activités nucléases) de Rad50 (activité ATPase) pour se lier et cliver l'ADN. Généralement, PCNA favorise les activités catalytiques de ses partenaires. Dans ce contexte, nous nous sommes demandé si la dynamique fonctionnelle du complexe Mre11-Rad50 n'était pas influencée par la présence de PCNA. Ainsi les efforts ont été portés sur la caractérisation *in vitro* de l'activité nucléase du complexe Mre11-Rad50 en coopération avec PCNA. En complément, des approches biophysiques (co-immunoprécipitation et résonance plasmonique de surface) ont été élaborées avec Sébastien Laurent, ingénieur de recherche au LM2E, pour caractériser physiquement l'association de ces protéines.

Ensemble, ces travaux ont pour objectif de révéler les caractéristiques physiques et fonctionnelles de l'association PCNA/MR pour proposer une fonction biologique à l'interaction de ces deux partenaires.





## II. RÉSULTATS

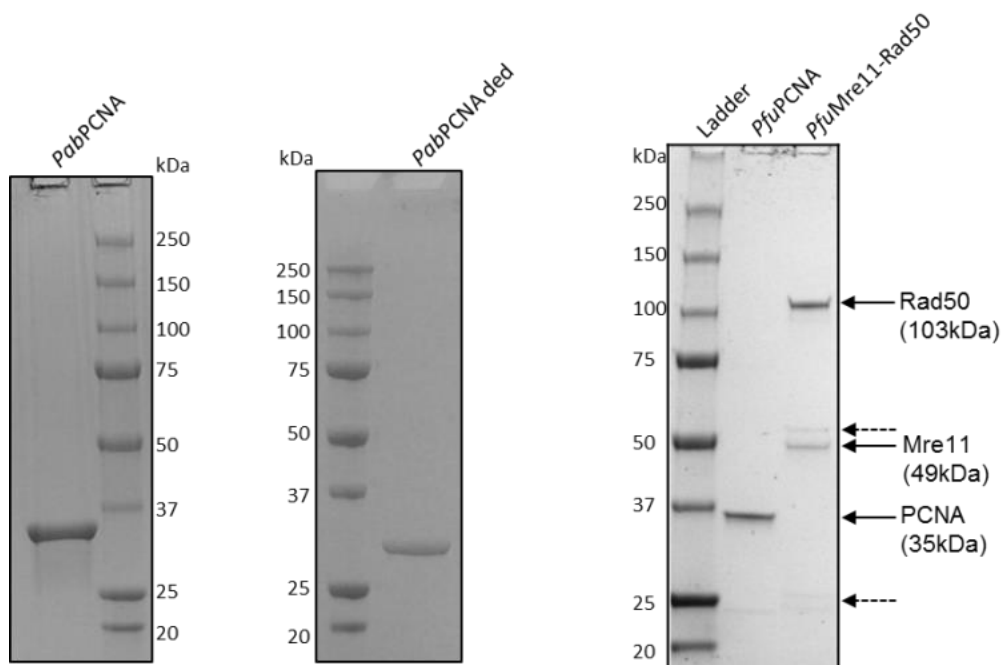
L'interaction entre PCNA et le complexe Mre11-Rad50 ayant été révélée à partir d'extrait cellulaire de *P. abyssi*, nous avons voulu dans un premier temps travailler avec des versions recombinantes des protéines de cette archée. Cependant, le niveau d'expression de la construction dont nous disposions au laboratoire ne permettait pas d'obtenir des quantités suffisantes de protéines. De plus la série d'essais nucléases menée sur le peu de complexe purifié ne démontrait aucune activité suggérant un éventuel défaut de la construction initiale. Il a été envisagé de travailler sur l'ensemble des conditions d'expression et de purification du complexe pour tenter d'optimiser le procédé, toutefois l'opportunité d'obtenir un clone contenant les gènes *mre11* et *rad50* de *P. furiosus* s'est présentée. Euryarchée hyperthermophile, *P. furiosus* est un proche parent de *P. abyssi* et partage une importante similarité de séquence protéique. Ainsi, entre les deux archées, les protéines Mre11 et Rad50 sont similaires à 75% et 70% respectivement, tandis que le taux de similitude pour la protéine PCNA s'élève à 95%. De plus, contrairement au complexe de *P. abyssi*, le complexe MR de *P. furiosus* est depuis le début des années 2000 caractérisé *in vitro* à la fois biochimiquement et structuralement. L'étude de l'interaction a donc été initiée avec un système hétérologue entre des espèces *P. furiosus* pour MR et *P. abyssi* pour PCNA avant de basculer complètement chez *P. furiosus* grâce au clone *PfuPCNA* envoyé par Bernard Connolly de l'université de Newcastle (Emtage et al, 2008).

### 1. PROTÉINES

Les protéines recombinantes ont été surexprimées et purifiées au laboratoire suivant les protocoles décrits dans la partie « Matériels et méthodes » (Figure 21). Pour plus de détails sur la purification par chromatographie, les profils d'élution des protéines *PfuPCNA* et *PfuMR* figurent en Annexe 2.

Le poids moléculaire du PCNA est prédit à 28 kDa, mais il est légèrement augmenté par l'ajout en position N-terminale de six et dix histidines pour respectivement *PabPCNA* et *PfuPCNA*. Nous pouvons constater ici qu'une bande de très faible intensité apparaît vers 25 kDa dans le profil de *PfuPCNA*. D'après les tests réalisés en spectrométrie de masse par l'équipe de B. Connolly (laboratoire nous ayant fourni le clone), cela correspondrait à une forme tronquée de PCNA dénué du His-tag en N-terminal (Cann et al, 1999). En effet, lors de la traduction de la protéine, la présence d'une méthionine interne au gène (*met73*) provoquerait une initiation de la traduction en aval du codon START. Cette forme se purifie tout de même sur colonne de nickel grâce à son association en trimère avec des unités de PCNA intègre. La solution pour s'en débarrasser sans perturber les fonctionnalités de la protéine serait de muter cet acide aminé en Leucine, ce qui a été par ailleurs réalisé pour des études de structure (Matsumiya et al, 2001). Toutefois, au vu de la quantité négligeable de PCNA tronqué, nous avons choisi de ne pas réaliser cette mutation et de poursuivre avec cette version de *PfuPCNA* pour nos essais tout en ayant conscience d'une potentielle hétérogénéité du trimère.

Quant au complexe *PfuMR*, celui-ci se forme naturellement *in vivo* par interaction entre l'unité Mre11 et l'unité Rad50 que nous pouvons visualiser comme forme majoritaire sur le gel ci-dessous. Des formes secondaires de faible intensité sont présentes au dessus de 50 kDa (I) et à 25 kDa (II). Une révélation par Western-blot avec des anticorps dirigés contre l'étiquette d'histidine portée par Mre11 indique qu'une des bandes à 25 kDa correspond bien à Mre11 (Annexe 2). Ces bandes apparaissent dès l'expression des protéines avant même les étapes de purification. Les poids moléculaires apparents de ces formes à 25 kDa semblent corrélérer avec un clivage entre les deux principaux domaines de Mre11 (domaines nucléase et capping). Tandis que la forme secondaire à 50 kDa pourrait correspondre à un clivage à la moitié de Rad50 au niveau du motif (CXXC) « crochet de zinc ». Encore une fois nous avons choisi de ne pas nous attarder sur ces formes étant donné le rapport de quantité en faveur des formes intègres de Mre11 et de Rad50 et de caractériser biochimiquement les activités nucléases du complexe MR pour en appréhender toutes les facettes.



**Figure 21. Profils électrophorétiques des protéines recombinantes en gel dénaturant.**

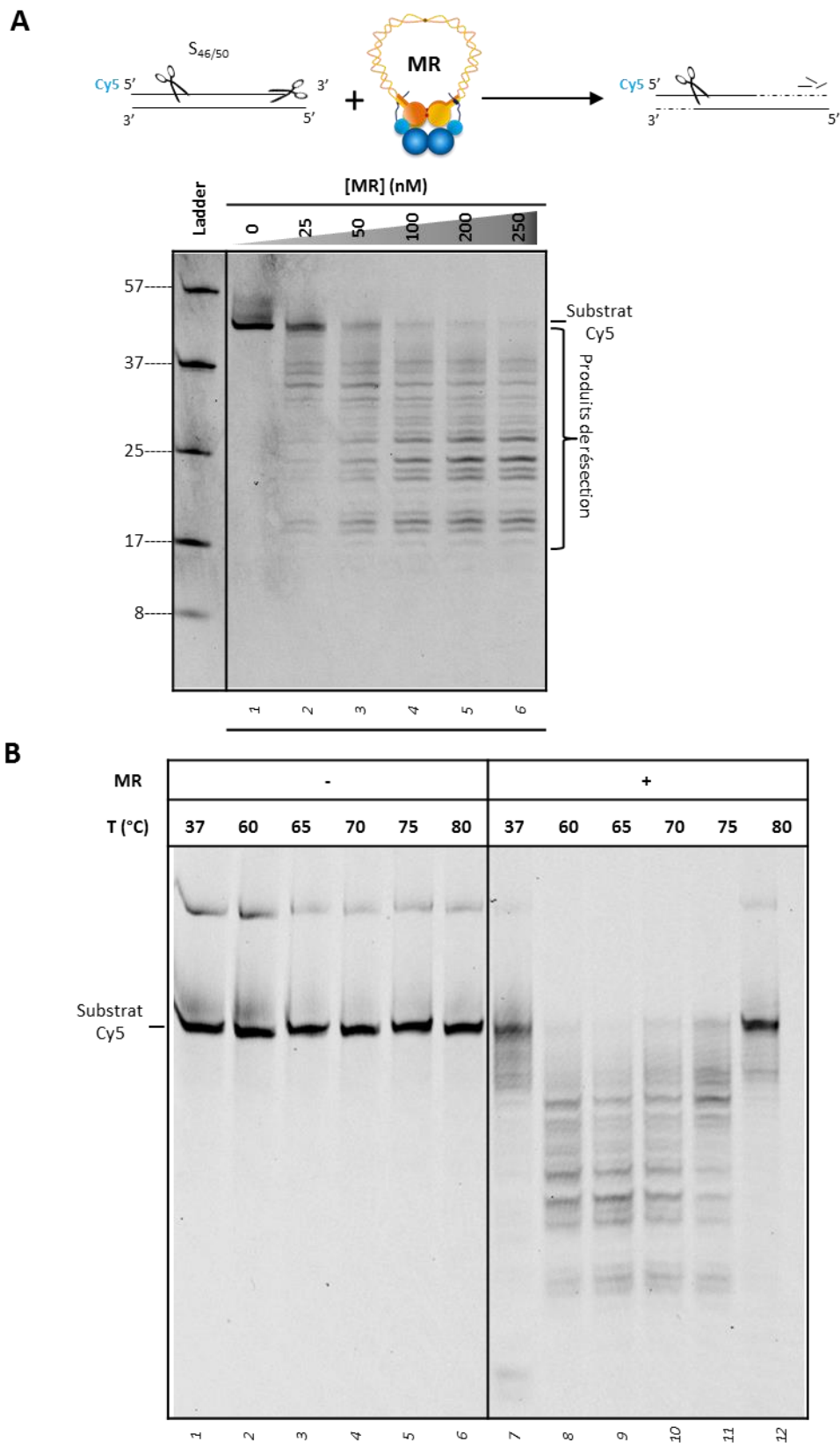
1 $\mu$ g de protéine ont été déposés pour *PfuPCNA* et *PfuMR*. Les flèches en pointillés indiquent la présence de formes secondaires des protéines.

## 2. APPRIVOISER LES ACTIVITÉS NUCLÉASES DE *PFUMR*

Activité endonucléase sur ADN simple et double brin, activité exonucléase sur ADN double brin, le complexe MR, à travers l'enzyme Mre11 s'attaque à la dégradation de l'ADN. Bien que déjà largement caractérisé biochimiquement, il m'a fallu dans un premier temps « apprivoiser » *PfuMR in vitro* avant de m'intéresser à un effet quelconque du PCNA sur ses fonctions nucléases. Pour cela, des séquences de 46 et 50 nucléotides (nt) ont été hybridées afin de créer un substrat ADN favorable aux actions du complexe MR. Ce substrat nommé  $S_{46/50}$  présente à la fois une extrémité double brin et une extrémité simple brin 5' favorisant la mise en place de l'activité exonucléase 3'→5' de MR (Hopkins & Paull, 2008). Le brin susceptible de subir la résection 3'→5' est marqué par un fluorochrome (Cy5) ce qui nous a permis de visualiser sur gel dénaturant les produits intermédiaires de cette dégradation (Figure 22.A). Pour des concentrations croissantes en complexe MR, le brin d'ADN initial est dégradé en fragments de différentes tailles appelés produits de résection. Ici nous pouvons constater qu'après deux heures de réaction à 70°C, le brin marqué Cy5 est dégradé partiellement par MR. Étonnamment, malgré une concentration en enzyme 50 fois supérieure à celle de l'ADN, le brin de 46 nt n'est pas réduit à des fragments inférieurs à 8 nt. Pour la suite des expériences, j'ai généralement privilégié l'utilisation d'une concentration en complexe MR (tétramère  $M_2R_2$ ) correspondant à un rapport ADN:MR de 1 :10 comme visualisé ici à 50 nM (Figure 22.A, piste 3). Ce rapport permet d'avoir des conditions dans lesquelles l'activité nucléase n'est ni trop faible ni trop importante afin de pouvoir observer des changements liés aux autres conditions réactionnelles.

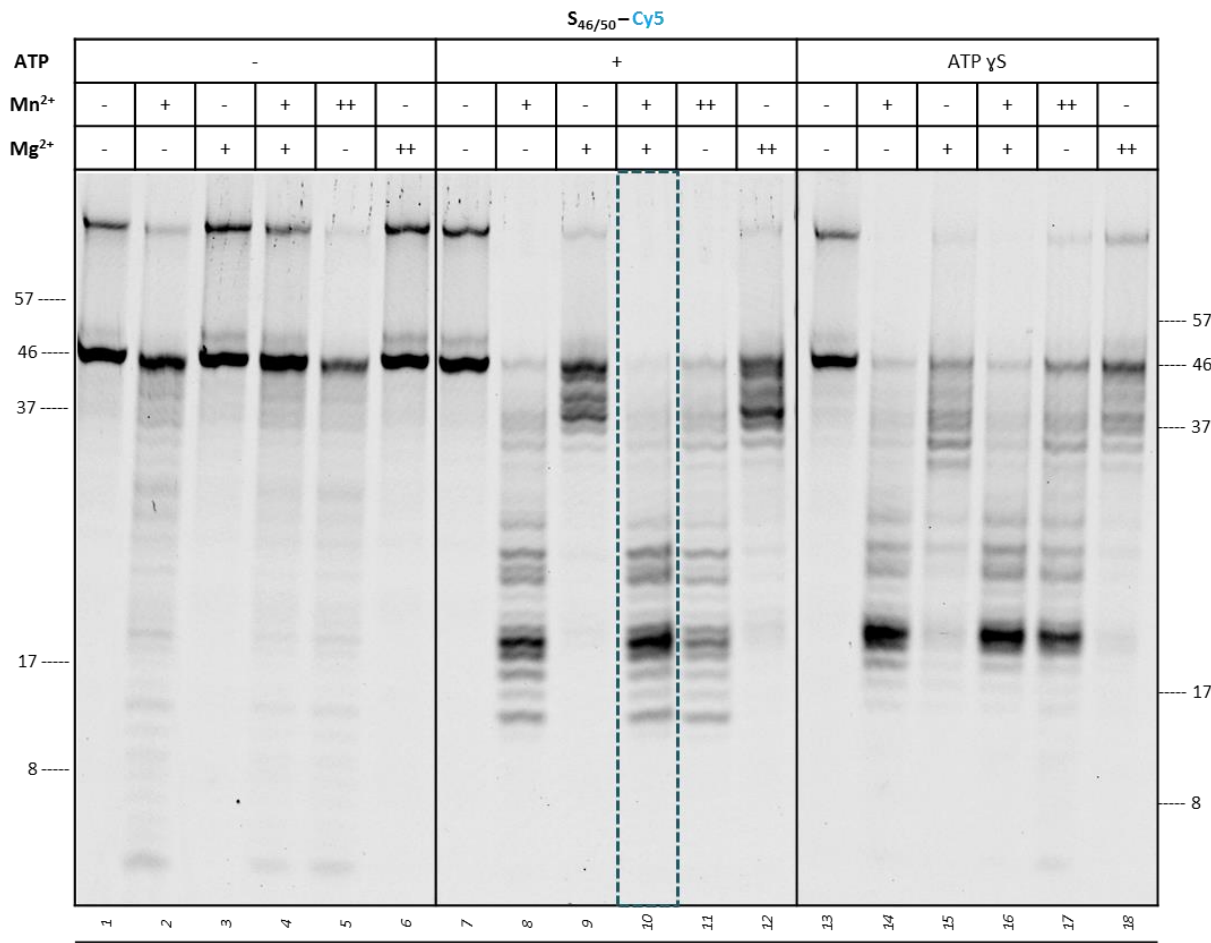
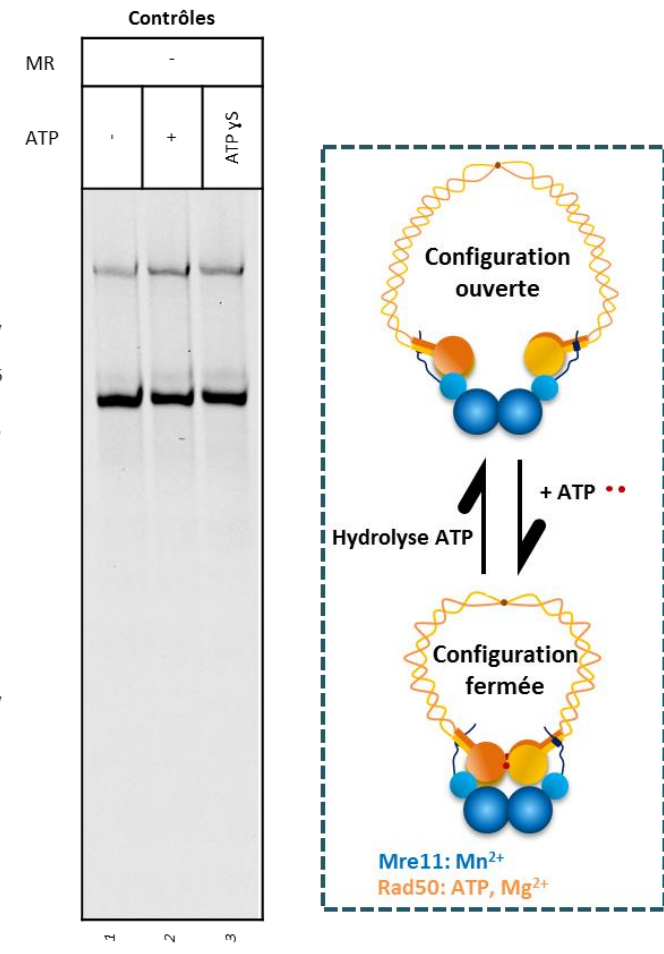
### a) À HAUTE TEMPÉRATURE

Avec un optimal de croissance à 100°C, *P. furiosus* est une espèce hyperthermophile comme *P. abyssi*. La gamme de température réalisée en Figure 22.B illustre bien le caractère thermostable de son complexe MR. Certes à 37°C, il semblerait y avoir un début de dégradation mais cette activité est très faible comparée à 60°C. Cette différence d'activité est à mettre en relation avec la plasticité de la structure du complexe, à 37°C elle est probablement rigide et ne permet pas un ancrage suffisant sur l'ADN pour permettre au brin d'ADN de pénétrer au sein du site actif de la nucléase. L'objectif étant de se rapprocher des conditions physiologiques autant que possible, la température d'incubation a été augmentée jusqu'à 80°C. Au-delà, l'intégrité du substrat ADN double brin n'était plus assurée comme cela a pu être vérifié en gel natif (Annexe 3). Si nous focalisons notre attention sur le brin de 46 nt restant, nous pouvons constater que bien que l'enzyme soit toujours active à 75°C, elle perd en efficacité après 70°C pour totalement disparaître à 80°C (Figure 22.C, piste 10, 11, 12). Cette perte d'activité après deux heures de réaction pourrait être liée à une perte de stabilité du complexe MR et/ou dénaturation de la BSA (*Bovin Serum Albumin*) sensible à partir de 69°C (Takeda et al, 1989) et qui favorise les interactions spécifiques.



**Figure 22. Dégradation du substrat ADN double brin par les activités nucléases de *Pfu*MR.**

(A) Incubation de concentrations croissantes en complexe MR avec 5 nM  $S_{46/50}$  pour 2 h de réaction à 60°C. (B) Effet de la température sur les activités nucléases de MR. Le substrat a été incubé avec 250 nM MR, 2h à la température indiquée. Le tampon réactionnel contenait 5 mM ATP/MnCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>.

**A****B**

**Figure 23. L'ATP modifie le profil de résection du substrat  $S_{46/50}$  par *Pfu*MR.**

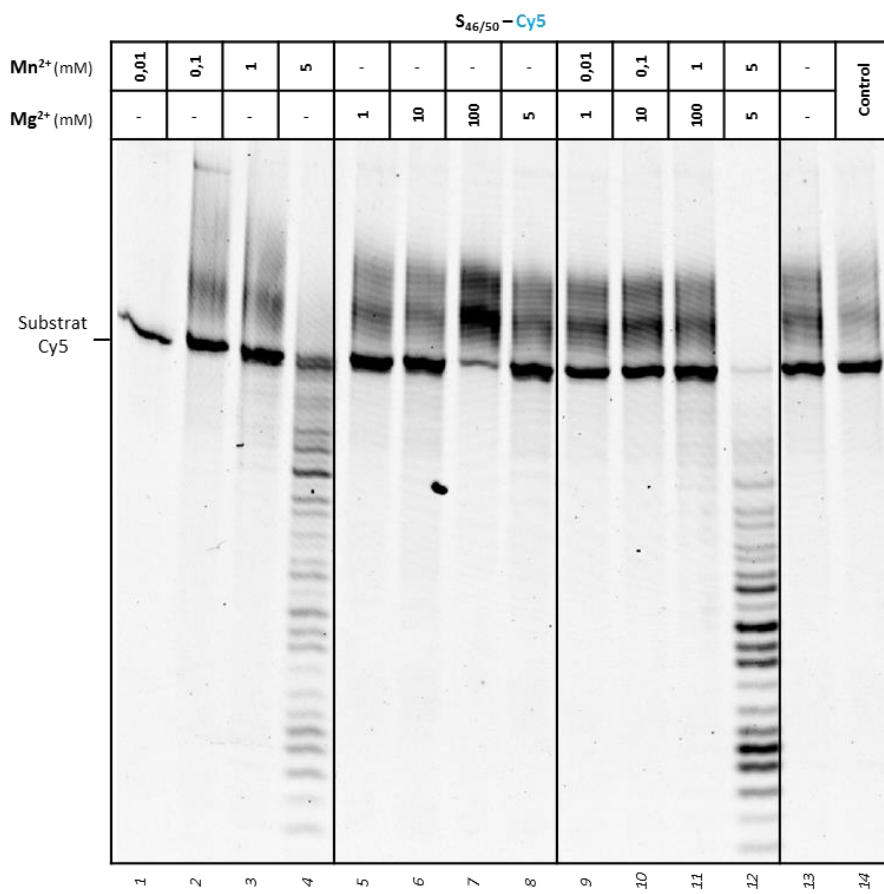
(A) Produits de dégradation du substrat sur gel dénaturant. 5 nM  $S_{46/50}$  ont été incubé 2h à 70°C avec 50 nM MR en présence lorsqu'indiqué de 5 mM ATP/ATP $\gamma$ S, 5 et 10 mM MnCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>. Les contrôles ont été réalisés ADN sans le complexe MR. (B) Schématisation du changement conformationnel opéré par le complexe MR en présence d'ATP.

### *b) L'ATP, VECTEUR DE TRANSFORMATION DU COMPLEXE MR*

De la famille ABC-ATPase, Rad50 fixe et hydrolyse des molécules d'ATP fournissant l'énergie nécessaire aux fonctions du complexe MR. Jusque là, de l'ATP avait été incorporé au milieu réactionnel car décrit comme nécessaire au fonctionnement nucléase du complexe MR sur de l'ADN double brin. Dans les essais en Figure 23.A (pistes 1 à 6), le complexe MR a pu cliver  $S_{46/50}$  sans requérir l'ATP, avec certes une efficacité bien moindre mais selon un profil de dégradation différent. En effet, si nous nous intéressons au profil de la piste 2, nous constatons que celui-ci est beaucoup plus étendu avec des fragments de taille inférieure à 8 nucléotides. L'ajout d'ATP change perceptiblement le résultat, les fragments sont espacés d'un nucléotide pour la plupart (piste 8), la résection s'opère base par base, caractéristique d'une activité exonucléase.

Les études antérieures réalisées sur la dynamique du complexe MR ont démontré que la fixation de l'ATP par Rad50 engendre la dimérisation des deux unités de Rad50 provoquant un mouvement de fermeture du complexe MR. Ce changement conformationnel réduit l'accessibilité de l'ADN au site actif de Mre11 et seule l'hydrolyse des molécules d'ATP permettrait l'ouverture de ce complexe comme illustré sur le schéma Figure 23.B. Ainsi le cycle de fixation et d'hydrolyse de l'ATP par Rad50 agirait tel un interrupteur sur les fonctions nucléases de Mre11 et le complexe pourrait être assimilé à un clapet s'ouvrant et se fermant alternativement.

En présence d'ATP $\gamma$ S (molécule faiblement hydrolysable), le profil de dégradation était similaire aux produits réactionnels en présence d'ATP (Figure 23.A, pistes 13 à 18). L'hydrolyse de l'ATP ne serait donc pas requise pour l'activité nucléase de MR. L'équipe de Scott Nelson a pu observer avec le complexe MR du phage T4 que pour une molécule d'ATP hydrolysée il y avait 4 nucléotides d'excisés (Herdendorf et al, 2011) émettant ainsi l'hypothèse que l'ATP servirait à la translocation du complexe le long de l'ADN. Ici, il est probable que les conditions réactionnelles employées avec l'ATP $\gamma$ S soit suffisantes pour le rendre hydrolysable et permettre le déplacement du complexe MR et le changement conformationnel. Mais pour que cette hydrolyse ait bien lieu, elle requiert des ions magnésiums exploités par Rad50 qui viennent en complément des ions manganèses nécessaires à Mre11.



**Figure 24. Les activités nucléases sont favorisées par la présence des cations  $Mn^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ .**  
 Produits de dégradation du substrat  $S_{46/50}$  sur gel dénaturant. 5 nM  $S_{46/50}$  ont été incubés 2h à 60°C avec 250 nM MR en présence lorsqu'indiqué de 5 mM ATP, 5 mM  $MnCl_2$ , 5mM  $MgCl_2$ . Le contrôle (piste 14) est sans le complexe MR.



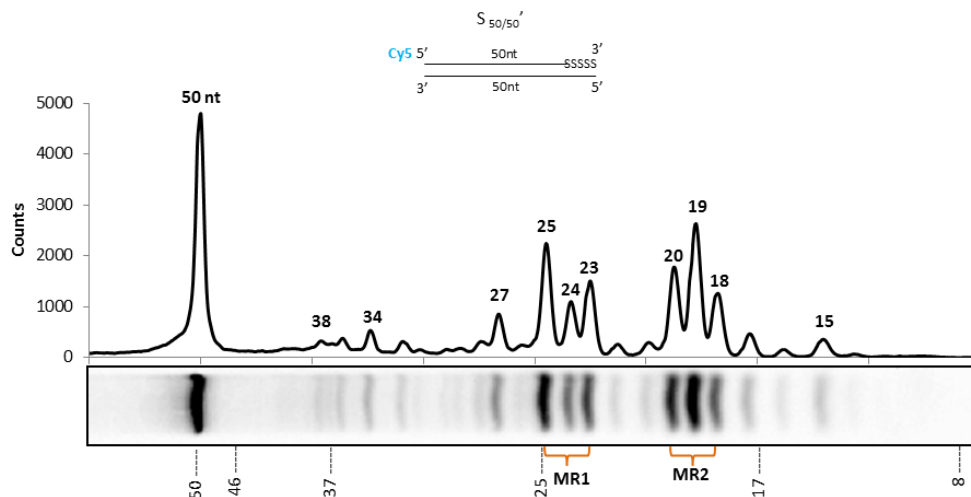
**c)  $Mn^{2+}$  OU  $Mg^{2+}$ , DES CATIONS MÉTALLIQUES AU RAPPORT**

Les premières publications concernant la caractérisation de Mre11-Rad50, réalisaient principalement les essais d'activité nucléase en présence de manganèse. En effet Mre11 utiliserait préférentiellement les ions  $Mn^{2+}$  pour catalyser le clivage de l'ADN. Structuralement, *Pfu*Mre11 dispose de deux sites de fixation pour les ions essentiels à son activité nucléase. Alors qu'une seule molécule de  $Mg^{2+}$  occuperait ces sites, deux molécules de manganèse pourraient venir s'y fixer, démontrant une meilleure affinité du  $Mn^{2+}$  pour le site actif de Mre11 que le  $Mg^{2+}$  (Hopfner et al, 2001). C'est bien ce qui est confirmé ici, car des produits de dégradation de l'ADN apparaissent uniquement lorsque le manganèse est présent dans le milieu (Figure 24, pistes 2 et 9).

Cette observation est étonnante dans la mesure où physiologiquement, la concentration intracellulaire du magnésium est bien plus importante que celle du manganèse. Par exemple, pour la bactérie thermophile, *Thermus thermophilus* les concentrations de 1,53 mM et 0,9  $\mu$ M respectivement pour le magnésium et le manganèse ont été mesurés, soit un facteur 1000 de différence (Kondo et al, 2008). Chez *P. abyssi* de premières mesures ont été effectuées sur le taux d'ions métalliques intracellulaire par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy) grâce à Stefan Lalonde du Laboratoire de Domaine Océanique. Le protocole d'extraction des ions et le calcul du volume des cellules restent encore à être optimisés. Cependant les premiers résultats ont déjà révélé un rapport de 100 entre le taux d'ions  $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ , le manganèse étant en minorité. D'autres mesures seront prochainement réalisées pour déterminer avec plus de certitude ces concentrations intracellulaires.

Pour les enzymes, il est possible que l'activité nucléase de MR soit ainsi régulée par le taux d'ions métalliques disponibles dans la cellule. Ce rapport de 100 a donc été testé dans les essais nucléases avec MR pour une concentration fixe en  $MnCl_2$  à 5mM (concentration minimale pour détecter une activité nucléase de MR). L'ajout de l'ion magnésium stimule l'activité nucléase de MR dès le rapport de 1:1 (Figure 24, piste 3). Le  $Mg^{2+}$  est donc aussi un ion important pour le complexe MR. Ceci est lié à Rad50, qui prend en charge la fixation et l'hydrolyse de l'ATP contrôlant ainsi l'accessibilité du substrat d'ADN au site actif de Mre11. Or Rad50 fixe préférentiellement les ions  $Mg^{2+}$  qui lui sont nécessaires à la réaction d'hydrolyse (Herdendorf et al, 2011). Combiner les deux ions métalliques dans le milieu permet ainsi de satisfaire les besoins des deux enzymes. Le ratio 1:1 à 5 mM a été privilégié pour la suite de l'étude.

**A**



**B**



**Figure 25. Activité endonucléase du complexe PfuMR sur le substrat ADNdb linéaire  $S_{50/50}'$ .**

(A) Profil de dégradation du brin Cy5 représentant l'intensité de fluorescence des fragments en fonction de la distance de migration (graphique supérieur). En dessous, extrait du gel dénaturant d'acrylamide 20 % où ont migré les produits de l'activité nucléase de MR, avec en parallèle la position des marqueurs de taille. Le brin Cy5 initialement mesurait 50 nt.

(B) Séquence du substrat  $S_{50/50}'$ . Les régions clivées par le complexe MR sont indiquées en orange.

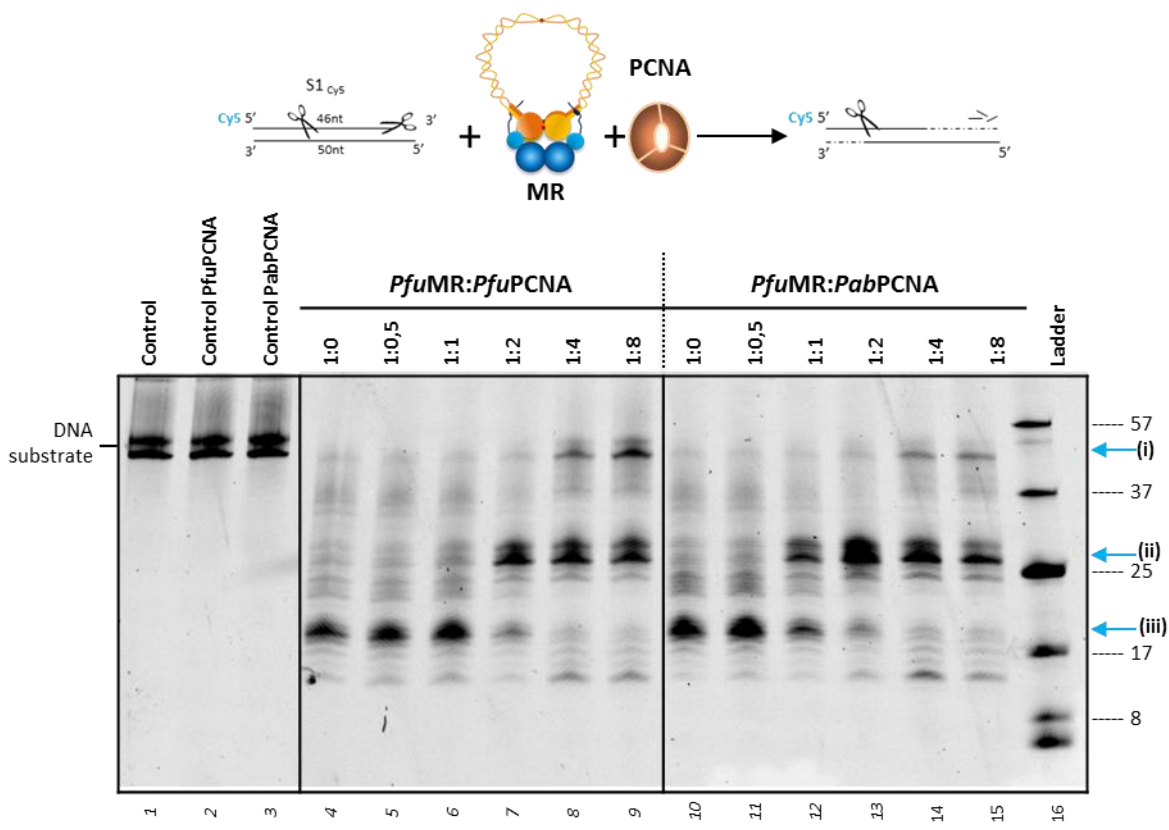
Les « S » représentent les liaisons non hydrolysables. Conditions : 5 nM  $S_{50/50}'$  incubé 2h à 60°C avec 250 mM MR en présence de 5 mM ATP/MnCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>.

### ✦ Profil de dégradation

L'enzyme Mre11 étant à la fois une 3'→5' exonucléase et une endonucléase, il est difficile d'affilier tous les produits de dégradation du substrat  $S_{46/50}$  à un type de clivage. Pour tenter de repérer les régions d'un clivage interne du brin, le substrat ADNdb  $S_{50/50}$  a été employé. Les séquences sont similaires à  $S_{46/50}$  excepté la présence à l'extrémité 3' du brin marqué Cy5 de liaisons phosphorothioates entre les cinq derniers nucléotides. Ces liaisons non hydrolysables empêchent la nucléase de s'attaquer au brin d'ADN par son extrémité 3'. Les produits générés ont donc pour origine des incisions endonucléolytiques.

Le profil de dégradation observé en Figure 25 a révélé deux zones où MR a focalisé son activité. Indiquées en orange, ces régions correspondent chacune à une prépondérance de trois fragments d'ADN. À partir du marqueur de taille et des distances de migration et il a été possible de déterminer le poids moléculaire et donc la taille en nucléotides des produits réactionnels. Le complexe MR coupe donc le substrat après les nucléotides 18/19/20 (MR1) et 23/24/25 (MR2). L'analyse de la séquence aux tailles correspondantes ne montre pas une redondance d'un motif en particulier ou même la présence d'une éventuelle structure secondaire de type épingle. La protéine Mre11 ne reconnaît pas particulièrement des séquences comme les enzymes de restrictions. Sa position sur l'ADN pour le clivage serait plus à corrélérer à une distance depuis l'extrémité 5' comme proposé par Hopkins & Paull, 2008, qui de même mettait en évidence des clivages endonucléolytiques entre 15 et 20 nucléotides. De manière intrigante ces zones de coupure génèrent une série de trois fragments distincts d'un nucléotide. Est-il possible d'imaginer que la coupure n'étant pas séquence spécifique coupe entre les positions 18-19 ou 19-20 ou encore 20-21 de manière aléatoire ? Une seconde question se pose, pourquoi deux régions de coupure ? Est-ce lié à la présence de deux sites actifs de Mre11 ?

Sur le substrat ADN exploité ici, les actions de clivage ont lieu sur les deux brins de l'ADN. Afin de s'affranchir de l'activité exonucléase processée sur le brin non marqué, un oligonucléotide avec des liaisons non hydrolysables à l'extrémité 3' a été employé pour former le substrat  $S_{46/50}$  utilisé dans les expériences à suivre. L'objectif étant de s'intéresser plus particulièrement à la relation entretenue par le complexe MR avec PCNA, j'ai poursuivi l'analyse de ce profil de dégradation en présence de l'anneau.



**Figure 26. PCNA modifie le profil de résection généré par l'activité nucléase du complexe MR.**

Le substrat ADN  $S_{46/50}$  (5nM) a été incubé 10 min à 70°C avec 50 nM MR et des concentrations variées en *Pfu* et *PabPCNA* (0, 25, 50, 100, 200 et 400 nM) en présence de 5 mM ATP/MnCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>. Contrôles : solution ADN sans protéine (1), avec 400 nM *Pfu* ou *PabPCNA* (2,3). Les flèches bleues indiquent les modifications majeures provoquées par la présence du PCNA.

### 3. QUAND LE COMPLEXE MR RENCONTRE PCNA

Les premières expériences d'interaction fonctionnelle ont été réalisées en présence du PCNA de *P. abyssi* en attendant d'obtenir son homologue chez *P. furiosus*. Tout deux se sont avérés avoir le même impact sur l'activité nucléase du complexe MR (Figure 26). Dans différentes interactions décrites comprenant PCNA, celui-ci généralement stimule l'activité enzymatique de ses partenaires, ce n'est toutefois pas une stimulation de l'activité nucléase de *Pfu*MR que j'ai constaté lors de ces expériences. Dans le profil de dégradation obtenu pour le brin marqué Cy5 (pistes 4 à 15), trois variations peuvent être notifiées (indiquées en bleu) lorsque la concentration en PCNA augmente : (i) le taux d'ADN initial (46 nt) restant est plus important, (ii) il y a une accumulation de fragments de 25 et 27 nucléotides et (iii) une réduction de la quantité de produits MR1 à (18, 19, 20 nt). Les modifications (ii) et (iii) surviennent pour des concentrations non saturantes en PCNA (pistes 7 et 13) suggérant un effet de celui-ci sur les activités de MR indépendamment d'une compétition pour la fixation à l'ADN. La diminution des fragments de plus petite taille en faveur de produits de taille supérieure nous laisse envisager au moins deux scénarios potentiels :

- Restriction du champ d'action du complexe MR, potentiellement en régulant son activité exonucléase.
- Relocalisation de l'activité endonucléase

Analyse cinétique, utilisation de substrats ADN plus long, blocage des extrémités 3', ces différentes expériences nous ont permis d'appréhender la mécanique en jeu lorsque PCNA et le complexe MR sont ensemble. Cette hypothèse d'interaction fonctionnelle vous sera présentée dans l'article qui suit.



### III. ARTICLE : INTERACTION *PfUPCNA* / *PfUMR*

#### PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Bien que n'ayant pas produit un nombre d'article suffisants pour présenter un manuscrit de thèse sur article, nous avons choisi de présenter les résultats qui suivent, sous une mise en forme publiable.

Les expériences préliminaires sur le système hétérologue *PabPCNA/PfuMR* ont révélé une influence du PCNA dans les activités nucléases de Mre11 sur les substrats ADNdb. Le PCNA de *P. furiosus* provoque la même réaction que son homologue. J'ai donc poursuivi les efforts sur la caractérisation fonctionnelle du partenariat *PfuPCNA/PfuMR* en jouant sur les extrémités et la taille des substrats ADN pour tenter de comprendre le mécanisme opéré par MR en présence de PCNA. De plus, les fonctions nucléases de Mre11 étant étroitement liées à la fonction ATPase de Rad50, nous avons aussi étudié cette activité en la présence du PCNA. Dans cette entreprise, j'ai été soutenue par Duy Khanh Phung et Béatrice Clouet-d'Orval, qui ont réalisé les mesures d'activité ATPase du complexe MR en utilisant la révélation de l'ATP par radioactivité au LMGM de Toulouse.

En complément des analyses fonctionnelles, des expériences de co-immunoprécipitation et de résonance plasmonique de surface (SPR) ont été menées avec Sébastien Laurent, ingénieur de recherche au sein de l'équipe, pour caractériser l'interaction physique entre les protéines recombinantes PCNA et Mre11-Rad50 de *P. furiosus*. De plus, la recherche de motif d'interaction spécifique au PCNA tel que le PIP motif montrait que Mre11-Rad50 ne présentait pas, *a priori*, dans sa séquence protéique de zones connues pour interagir avec l'anneau. Mais l'obtention de *PfuPCNA* puis des différentes unités du complexe *PfuMR* ont permis d'analyser plus en détails l'association des protéines.

Ensemble, ces approches ont fourni suffisamment de données pour aboutir à la rédaction de l'article que vous découvrirez juste après. Cette version sera très certainement révisée au vue de la récente collaboration avec Gareth Williams du laboratoire de John Tainer à Berkeley. En effet, les résultats obtenus sur cette interaction PCNA/MR ont suscité son intérêt pour mener à bien une approche structurale qui viendrait compléter cette étude avec un tout nouveau volet de données.

Des résultats supplémentaires seront présentés à la suite de cet article ainsi qu'une discussion plus élargie sur l'ensemble des données acquises et les perspectives envisagées et envisageables.

**Insights into physical and functional interplay between PCNA and Mre11/Rad50 complex  
from *Pyrococcus furiosus***

Gaëlle Hogrel<sup>1,2,3</sup>, Sebastien Laurent<sup>1,2,3</sup>, Duy Khanh Phung<sup>4</sup>, Audrey Bossé<sup>1,2,3</sup>, Pierre François Pluchon<sup>1,2,3,‡</sup>, Yang Lu<sup>1,2,3</sup>, Béatrice Clouet-d'Orval<sup>4</sup> and Didier Flament<sup>1,2,3,\*</sup>.

<sup>1</sup>Ifremer, UMR6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, 29280 Plouzané, France.

<sup>2</sup>Université de Bretagne Occidentale, UMR6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, 29280 Plouzané, France.

<sup>3</sup>CNRS, UMR6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, 29280 Plouzané, France.

<sup>4</sup>Université de Toulouse; UPS, 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France; CNRS; LMGM; F-31062 Toulouse, France.

\*Corresponding author:

Didier Flament

Ifremer, centre de Brest

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (UMR 6197)

Technopole Brest-Iroise

29280 Plouzané

Phone : +33 298 224 527

e-mail : [dflament@ifremer.fr](mailto:dflament@ifremer.fr)

‡Present address:

Centre National de la Recherche Scientifique, UMR8226,

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes,

Institut de Biologie Physico-Chimique,

75005 Paris, France

e-mail : pierre-francois.pluchon@ibpc.fr



## **ABSTRACT**

Several archaeal species prevalent in extreme environments are particularly exposed to DNA damage such as Hyperthermophilic Archaea (HA) living at temperatures above 70°C. They arguably have efficient strategies and robust genome guardians to repair DNA damage threatening genome integrity. In contrast to eukaryote and other archaea, homologous recombination appears to be a vital pathway in HA, and MR complex exerts a broad influence on the initiation of this DNA damage response process. In a previous study we identified a physical association between the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and the Mre11-Rad50 (MR) complex. By performing co-immunoprecipitation and SPR analyses, we identified a short motif at the C-terminal portion of *P. furiosus* Mre11 implied in the interaction with PCNA. Through this work we unveiled a PCNA-interaction motif corresponding to a variation on the PIP motif theme which is specially conserved among Mre11 sequences of Thermococcale species. Besides, we demonstrated functional interplay *in vitro* between *P. furiosus* PCNA and MR enzymatic functions in the DNA end resection process. PCNA alters MR nuclease activities for DNA end resection and promotes an endonucleolytic incision proximal to 5' strand of double strand DNA break.

## INTRODUCTION

Extremophile organisms provide amazing study systems to understand cellular processes allowing them to live under conditions likely to cause a high rate of DNA damages. Several archaeal species prevalent in extreme environments are particularly exposed such as Hyperthermophilic Archaea (HA) living at temperatures above 70°C. Nonetheless, several studies have shown that HA like *Pyrococcus furiosus* and *Sulfolobus solfataricus* can fully restore their genomes fragmented by  $\gamma$ -radiations (Gerard et al, 2001; Larmony et al, 2015; Peak et al, 1995). They arguably have efficient strategies and robust genome guardians to repair DNA damage threatening genome integrity. Those guardians are proteins working and interacting altogether in a carefully orchestrated ballet. Archaea employ “eukaryotic” DNA replication and repair complex proteins (Kelman & Kelman, 2014) but several DNA repair protein families have not been identified in archaea and yet are broadly conserved among bacteria and eukaryotes (Grogan, 2015). Using *in silico*, genetic or biochemical approaches, several studies revealed new actors or new complexes involved in genomic integrity in Archaea (Fujikane et al, 2005; Giroux & MacNeill, 2015; Guy & Bolt, 2005; Li et al, 2011b; Li et al, 2010; Meslet-Cladiere et al, 2007; Pluchon et al, 2013; Ren et al, 2009; Shiraishi et al, 2015; Tori et al, 2013), leading to the characterization of new helicases and nucleases, like Hel308, GAN, NucS and more recently NerA, essential to understand better the genomic maintenance processes in Archaea. In a previous study we also identified a physical association between the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and the Mre11-Rad50 (MR) complex (Pluchon et al, 2013), the characterization of which is the subject of the present study.

Structurally conserved between archaea and eukaryotes, PCNA is a multimeric, ring-shaped factor that encircles DNA duplex. Archaeal Replication Factor C complex (RFC), that functions as a clamp loader, stimulates PCNA assembly around DNA even if archaeal PCNA can load spontaneously onto DNA (Henneke et al, 2002). Essential for cell viability, PCNA was firstly reported as a processivity factor for DNA polymerases, this DNA-clamp is a moving platform for numerous partners involved in DNA replication and repair pathways (Maga & Hubscher, 2003). Extensive lists of PCNA partners have been noted in reviews (Gilljam et al, 2009; Moldovan et al, 2007; Pan et al, 2011).

The MR complex exerts a broad influence on the DNA damage response network, especially on the DNA Double-Strand Breaks (DSB) repair (Stracker & Petrini, 2011). As DSBs are a particularly threatening type of DNA damage, induced by external agents as well as by internal molecular events, cells have evolved a highly sophisticated DNA damage response system. For the recognition and repair of DNA breaks, the two major mechanisms are Homologous Recombination (HR) and Non Homologous End-Joining (NHEJ). In HR, the broken ends are resected into 3' single-strand tails then used as templates for homology search, whereas in NHEJ, the broken ends are directly rejoined (for reviews see Daley et al, 2015; Goodarzi & Jeggo, 2013; White, 2011). In eukarya, DSBs are repaired by either HR or NHEJ depending on the cell cycle (Huertas, 2010). NHEJ was assumed to be absent in

archaea until Bartlett *et al.* reconstitute an archaeal NHEJ apparatus *in vitro* similar to that of the bacterial machinery (Bartlett et al, 2013). In contrast to eukaryote and other archaea, HR appears to be a vital pathway in HA, since genetic analyses have shown that the *mre11*, *rad50* and *radA* genes are essential for *Thermococcus kodakaraensis* (Fujikane et al, 2010).

The eucaryotic macromolecular machine MR(N/X) is composed of the two core proteins Mre11 and Rad50, with an additional component: Nbs1 for higher eukaryotes or Xrs2 for yeast which are not found in bacteria and archaea. Both Mre11 and Rad50 are highly conserved in all three biological kingdoms and even exist as gp46/47 in some virus like the phage T4 (Herdendorf et al, 2011). The MR complex engages the HR pathway by tethering and resecting DNA ends through a combination of nuclease and ATPase activities tightly related with conformational changes (reviewed by Lafrance-Vanasse et al, 2015). However, the MR complex nuclease functions, 3'→5' dsDNA exonuclease activity and ssDNA endonuclease activity, are not sufficient to generate a long 3' ssDNA tail and require additional partners to catalyse efficient DSB resection (Paull, 2010). Besides, the MR complex appears to be essential in replication fork restart in eukaryote cells but to date the biochemical and regulation mechanisms remain incompletely understood.

The apparent essentiality of HR components in some species of archaea strongly suggests an involvement of this machinery at the replication fork. So, given the role of PCNA to orchestrate DNA replication and other DNA processes, we wondered if this newly interaction with Mre11-Rad50 in *P. abyssi* would regulate MR enzymatic functions in the DNA end resection process. For this study, we sought to better characterise the biochemistry of this complex from the close species *Pyrococcus furiosus*.

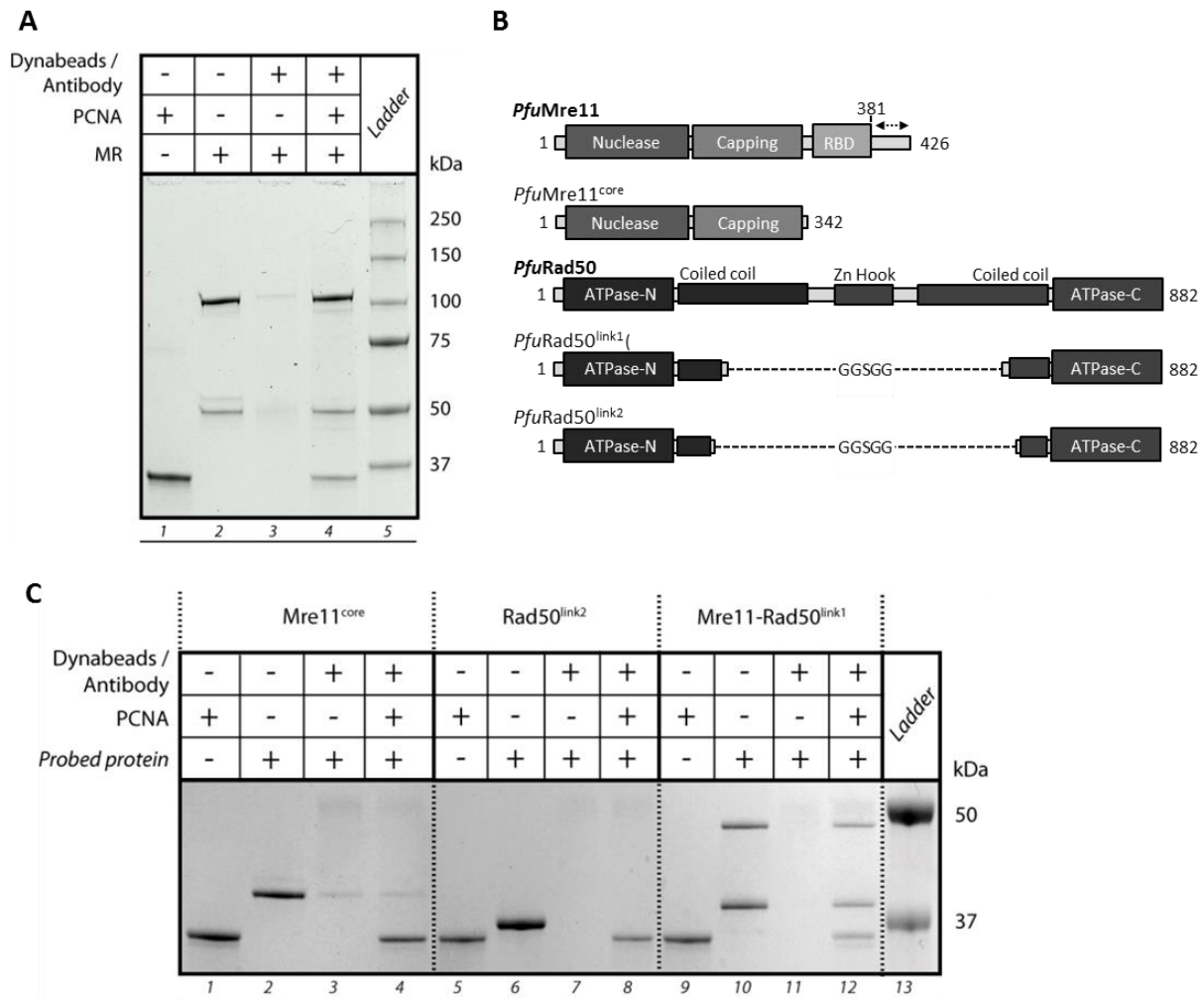
By performing co-immunoprecipitation and SPR analyses, we demonstrated physical association between *P. furiosus* PCNA and the MR complex, and identified a short motif at the C terminal portion of Mre11 that interacts with PCNA and corresponds to a variation on the PIP motif theme. Enzymatic assays showed that PCNA alters the degradation pattern of MR complex on dsDNA substrates and promotes an endonucleolytic incision proximal to 5' strand of ds DNA break in a manner still consistent with HR process requirements.

## RESULTS

### ***P. furiosus* PCNA physically interacts with the MR complex.**

The majority of archaeal and eukaryotic PCNA are homotrimers organized in a head-to-tail conformation like a ring while the archaeal MR complex works as a heterotetramer  $M_2R_2$  with a catalytic head module formed by Mre11 dimer and the ABC ATPase domains of Rad50 (Hopfner et al, 2000a). PCNA and MR complex from *P. furiosus* were produced and purified (Figure S1.A) and using co-immunoprecipitation we demonstrated that these two components formed a complex in solution as shown by the co-precipitation of MR complex with the PCNA (Figure 1.A). We then explored some conditions where this association could take place. As illustrated in Figure S1.B the complex could form in presence or absence of metallic co-factor and ATP and was also stable in a range of salt concentration (150 mM to 300 mM, data not shown). As the proteins were DNA free, we assumed that the interaction between MR complex and PCNA is not dependent on DNA substrates.

To investigate the surface of interaction between MR complex and PCNA, we benefited from using three Mre11 and Rad50 deletion constructs (gift from G. Williams and J. Tainer). Mre11<sup>core</sup> (residues 1–342) lacks 82 C-terminal residues, which does not affect nucleolytic activity ; Rad50-link2, an untagged version of Rad50 with shortened coiled coils connected by intramolecular Gly-Gly-Ser-Gly-Gly sequence and Mre11-Rad50-link1 a complex of a similar shortened version of Rad50 and Mre11 full-length (Figure 1.B). Interestingly, only the Mre11-Rad50-link1 construct could form a complex with PCNA in solution (Figure 1.C, lanes 4, 8, 12). These data indicated that PCNA does not interact directly with Rad50 and that the coiled-coils domain of Rad50 is not required for the MR complex recruitment onto PCNA. On the other hand, these observations raised two non-exclusive hypotheses: PCNA/MR interaction require the prior MR complex formation and/or is mediated by the C-terminal region of Mre11. With the exception of a domain interacting with the base of Rad50's coiled-coils (348-381), the C-terminal domain of *Pfu*Mre11 is predicted to be disordered or flexible and is thought to be responsible for protein-protein and protein-DNA interactions (Lafrance-Vanasse et al, 2015).



**Figure 1. Physical association of *P. furiosus* PCNA and Mre11-Rad50.**

(A) The MR complex co-precipitates with PCNA – input control (lane 1), target control (lane 2), pull-down control without prey (lane 3), pull-down (lane 4).

(B) Construct schematics for *Pfu*PCNA, *Pfu*Mre11 and *Pfu*Rad50 (Williams et al, 2011). *Pfu*Rad50-link constructs contain Gly-Ser repeat sequences to intramolecularly link Rad50 N and C lobes. In *Pfu*Mre11 sequence, dotted arrow indicates a disordered region.

(C) Co-immunoprecipitation assays with PCNA and the different Mre11 and Rad50 proteins – input controls (lanes 1, 5, 9), target controls (lanes 2, 6, 10), control assay without PCNA (lanes 3, 7, 11), co-immunoprecipitation assay with PCNA and the probed protein (lanes 4, 8, 12).

### The C-terminal region of *P. furiosus* Mre11 contains a putative PCNA interacting motif.

PCNA-binding partners generally possess a PCNA-Interaction Peptide (PIP) motif, usually located at the extreme N- or C-terminus (Winter & Bunting, 2012). The results prompted us to look for a potential PIP motif at the C-terminal portion of Mre11. PIP peptides usually interact with the InterDomain Connecting Loop (IDCL), a region linking the two similar domains of a PCNA monomer and neighboring regions (see scheme Figure 1.B). The core element of the PIP-box is a peptide with a sequence Qxx $\phi$  ( $\phi$  being hydrophobic residues L, M or I), which in most cases is C-terminally flanked by the sequence xx $\Omega\Omega$  ( $\Omega$  being aromatic residues F or W) (Warbrick, 1998). Based on the alignment

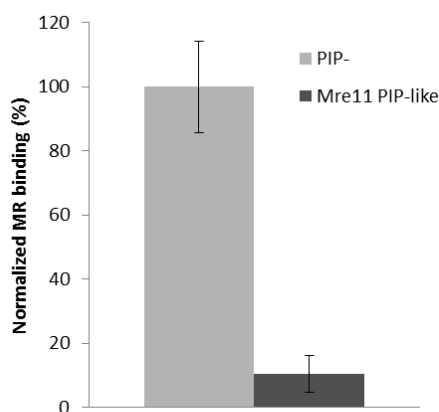
of PIP-Box like sequences (QXX $\phi$ XX $\Omega\Omega$ ) from a library of *Pyrococcus sp.* proteins with already described affinity for PCNA (Pan et al, 2011), we identified a candidate PCNA interacting peptide in the C-terminal region of *PfuMre11* (Figure 2.A). Located at the extreme C-terminal region of Mre11 (positions 414-424) the motif exhibits the conserved hydrophobic residues but lacks the otherwise conserved glutamine residue. In addition the N-terminal portion of the motif is composed of a stretch of basic residues known to interact with the positively charged outer surface of the PCNA (Gulbis et al, 1996). As Meslet-Cladiere *et al.* described, high affinity peptides for PCNA tend to be positively charged (Meslet-Cladiere et al, 2007). Here the identified peptide has a predicted Isoelectric Point (pI) of 10.29 consistent with this property. The 3D structure of the complete C-terminal Mre11 region has not been resolved to date, however Hydrophobic Cluster Analysis identified this motif as a globular region and showed that the hydrophobic residues clustered with a similar shape observed for canonical PIP motif sequences (data not shown). Although this motif lacks the glutamine conserved residues, these features strongly suggest that it could act as a hydrophobic anchor on the PCNA.

We then looked at the occurrence of this motif on the Mre11 sequences among several Thermococcale species. Remarkably all the available sequences displayed this putative PCNA interacting motif in the C-terminal region (Figure S2.A). From this alignment we could derive a pattern ([PK]-x-[KRNA]-x(3,5)-[IL]-x-[SAVD]-[WF]-[ILV]) for a motif search using Scanprosite on archaeal proteins sequences from Swiss-prot and TrEMBL databases. This pattern was detected in Mre11 sequences from only Thermococcale order except for an Archeoglobale, *Archeoglobus fulgidus*. We could also identify that several Hel308 archaeal members of the superfamily 2 of helicases possessed a similar motif at the extreme C-terminal region. The presence of this PIP-like motif in Hel308 sequences showed the same repartition as in the sequences of Mre11, as only the thermococcales Hel308 helicases harbored the motif, with the exception of *Thermococcus litoralis*. In addition, the alignment of the C-terminal region of Hel308 and Mre11 proteins showed a strong conservation of the hydrophobic residues at the C-terminal portion of the motif, suggesting further that this structural element could serve as a hydrophobic plug on the surface of PCNA. Most noticeably, the interaction between PCNA and Hel308 from *P. furiosus* has been described and using deletion mutant lacking the 20 residues at the extreme C-terminal region, the authors proposed that this portion could mediate the interaction with PCNA (Fujikane et al, 2006), consistent with our analysis

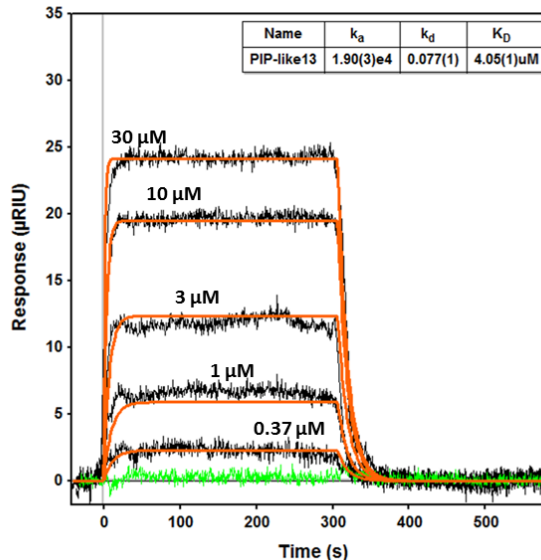
**A**

<i>Pfu</i> (414-425)	K	K	K	R	G	T	.	.	L	D	S	W	L	G
<i>Pab</i> (411-422)	P	K	N	P	G	D	.	.	I	M	A	W	V	K
<i>Pho</i> (400-411)	P	K	N	P	G	D	.	.	L	T	A	W	L	R
<i>PspNA2</i> (400-411)	P	K	K	P	G	D	.	.	L	M	A	W	L	R
<i>Pya</i> (400-411)	P	K	K	R	G	D	.	.	L	L	A	W	L	R
<i>PspST04</i> (412-423)	P	K	K	K	G	D	.	.	I	L	A	W	L	G
<i>Pfe</i> (429-442)	P	D	R	K	G	S	V	T	L	D	A	F	L	K
<i>Ppa</i> (432-443)	K	K	A	V	G	K	.	.	L	D	A	W	L	K
<i>Tga</i> (447-458)	P	K	K	K	S	D	.	.	I	L	A	W	L	K
<i>TspAM4</i> (451-462)	P	A	K	P	S	S	.	.	L	D	A	W	L	R
<i>Tna</i> (451-462)	P	K	K	G	P	N	.	.	L	L	A	W	L	G
<i>Ton</i> (442-453)	P	A	K	P	S	S	.	.	L	D	A	W	L	R
<i>Teu</i> (441-452)	P	S	K	G	S	N	.	.	L	L	D	W	L	G
<i>Tko</i> (446-457)	P	K	K	K	S	D	.	.	L	L	S	W	L	K
<i>Tzi</i> (438-449)	P	A	K	P	S	S	.	.	L	D	A	W	L	R
<i>Tpa</i> (431-442)	P	K	K	K	S	D	.	.	L	L	A	W	L	G
<i>Tba</i> (431-442)	P	K	K	K	S	D	.	.	I	L	A	W	L	K
<i>Tli</i> (427-438)	P	K	K	V	G	T	.	.	I	D	A	W	L	G
<i>TspPK</i> (430-441)	P	K	N	P	S	S	.	.	L	D	A	W	L	R
<i>Tsi</i> (429-440)	P	A	K	P	S	S	.	.	L	D	A	W	L	R
<i>Tsp4557</i> (455-466)	P	E	K	K	S	D	.	.	L	L	S	W	L	K
<i>Tcl</i> (450-461)	P	S	K	G	S	N	.	.	L	L	V	W	L	G

**B**



**C**



**Figure 2. Identification of a putative PCNA binding motif in the C-terminal region of *PfuMre11*.**

(A) Sequence alignment of PIP motif previously identified in some *Pyrococcus sp.* proteins. To identify the putative PCNA binding motif, we used the motif-based sequence analysis tools from the MEME suite (version 4.10.1) (Bailey & Elkan, 1994) and the ProtParam algorithm was used to predict isoelectric points for the different peptides (Wilkins 1999). For sequence analysis, *P. furiosus* Mre11 sequence was used as reference (Uniprot ID: Q8U1N9) to find proteins with similar sub-sequences as the sequence region of interest. To that aim, PHI-BLAST program from BLAST suite (NCBI) was queried with the input pattern [PK]-X(5)-[LI]-X(2)-W-[LIV] as anchor

(B) Western blot signals of Mre11 from competitive co-immunoprecipitation assays were normalized with corresponding signals obtained along with a peptide control (PIP-). An assay without peptide was performed to co-precipitate MR with PCNA (Control). Error bars represent standard deviation.

(C) Surface plasmon sensogram for binding of Mre11 peptide to PCNA for a concentration range from 0.37 μM to 30 μM of peptide. Values were estimated using global fitting analysis that accounts for both association and dissociation phases as well as the maximal level of complex formation. See also Figure S2.

**The C-terminus Mre11 peptide competes for PCNA/MR interaction.**

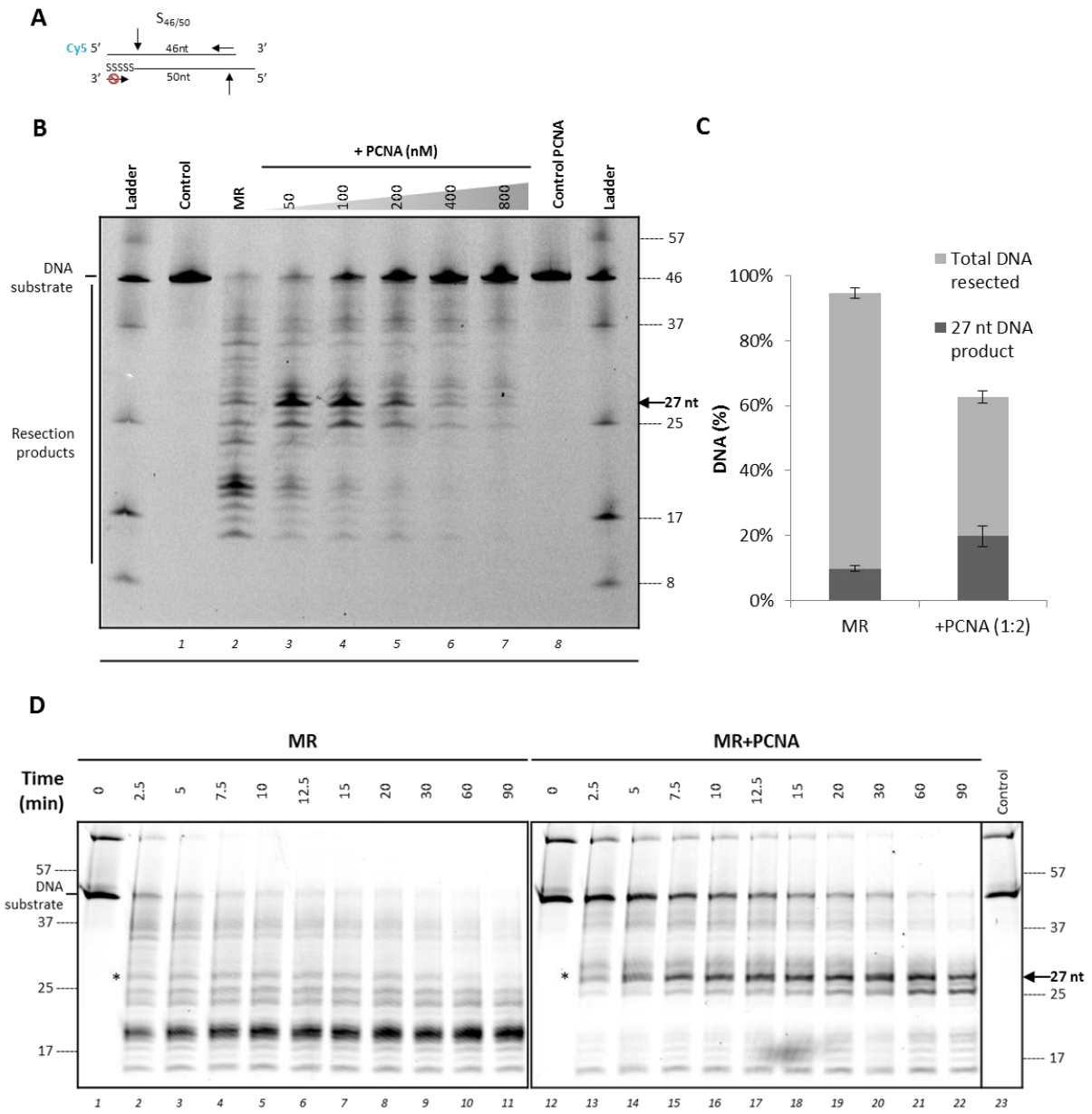
Altogether these observations prompted us to verify the assumption that the C-terminus of Mre11 contributes to the PCNA/MR complex association. To this aim, we performed pull-down competitive assays with the Mre11 peptide corresponding to the unearthed motif (412-KKKRGTLDLWGG-424). Figure 2.B revealed that an excess of Mre11 peptide (Mre11 PIP-like) significantly blocked PCNA/MR interaction compared to the control peptide (PIP-). As shown in the graph, the amount of Mre11 decreased in the assay with the competitive peptide (at least ten fold) suggesting that this peptide inhibits the assembly of the PCNA/MR complex. Interestingly, we obtained a similar inhibition with a canonical PIP motif peptide derived from the sequence of another nuclease, *P. abyssi* NucS (Figure 2.B). To test whether the C-terminal sequence of Mre11 could mediate the interaction of MR complex with PCNA, we used Surface Plasmon Resonance (SPR) with *Pfu*PCNA immobilized on a solid support. SPR measurements indicated that the Mre11 peptide physically interacts with the homotrimeric *Pfu*PCNA at a micromolar range of concentrations (Figure 2.C). It is interesting to note that the binding value (4.05  $\mu$ M) correlates with the  $K_D$  values obtained with NucS PIP (Figure S2.C). Together, these results suggest that the primary docking site of Mre11 on PCNA could be similar to that described for PIP-motif proteins.



**PCNA alters MR nuclease activities for DNA end resection.**

In Archaea as in several organisms, MR complex is implicated in early steps of HR pathway. Thanks to a combination of Mre11 nuclease and Rad50 ATPase activities, the MR complex initiates DNA end resection to provide suitable DNA template used by subsequent HR components. In several *in vitro* studies, *Pfu*Mre11 displayed distinct activities: 5'→3' double-stranded (ds)DNA exonuclease, single-stranded (ss)DNA endonuclease and endonucleolytic cleavage on the 5' strand at a break (Herdendorf et al, 2011; Hopfner et al, 2001; Hopfner et al, 2000a; Hopkins & Paull, 2008; Paull & Gellert, 1998). Given the dsDNA substrate preference of PCNA, we tested the influence of PCNA on dsDNA exo and endonuclease activities of MR complex using synthetic dsDNA oligonucleotides.

To this end, nuclease assays on a linear 3' recessed dsDNA substrate (S46/50) were performed. The unlabelled complementary strand has phosphorothioate bonds at its 3' end to block 3'→5' exonuclease activity at this extremity (Figure 3.A) in order to characterize exo- and endonuclease activities on the top strand irrespective of exonuclease degradation of the complementary strand. At 70°C during 10min, the MR complex was incubated with increased concentration of PCNA and fluorescence revealed DNA fragments from the 5'-labeled strand (Figure 3.B). As shown in lane 2, the 5'-labelled strand was degraded by MR complex, with a small major product at about 16 nucleotides (nt), consistent with reported Mre11 nuclease activities. In presence of increasing concentrations of PCNA, we observed a marked change in the degradation pattern (Figure 3.B, lanes 3-7) with an accumulation of DNA fragments above 27 nt at stoichiometric ration of MR complex and PCNA. When PCNA was added in excess, we observed an inhibition of the reaction, nearly complete at 1/8 ratio. The graph in figure 3.C shows a quantification of this effect from triplicate experiments whereby the generation of 27 nt major products increases by nearly 2 fold. The same experiment was performed using a PCNA mutant defective in trimerization, from the close species *Pyrococcus abyssi* and showed that PCNA had to be loaded onto DNA to generate a change in the degradation profile (Figure S3.A). The effect of PCNA on the metal dependence for nucleolytic degradation was also studied. Mre11 has two metal binding sites for which manganese has a higher affinity (Hopfner et al, 2001) whereas Rad50 needs magnesium to hydrolyse ATP (Hopfner et al, 2000b). The figure S3.B shows that dsDNA nucleolytic cleavage strongly required both ATP and manganese. A weak nuclease activity was observed in magnesium solution, but PCNA had little effect on Mg<sup>2+</sup> dependent reaction of MR complex.



**Figure 3. PCNA alters the degradation pattern generated by MR nuclease activities.**

(A) S46/50 is a 46/50 nucleotide dsDNA substrate with a 5'-labeled end and phosphorothioates bonds (SSSSS) at a 3'-end. Black arrows illustrate potential nucleolytic cuts by MR complex, vertical arrows for endonuclease cleavage site and horizontal arrows for 3'-5' exonuclease activity.

(B) *In vitro* DNA end resection activities of MR complex in presence of PCNA – control included 10 nM S46/50 without protein (lane 1), reaction with 100 nM MR (lane 2), reaction with 100 nM MR complemented by increased concentrations of PCNA (lanes 3-7) and control with 800 nM PCNA exclusively (lane 8).

(C) Quantitation of the % DNA resected after reaction and the percentage of the 27 nt DNA product. Error bars represent standard deviation. (B, C) Reactions included 10 nM of dsDNA S46/50 incubated with 100 nM MR complemented by 200 nM PCNA at 70°C, 10min.

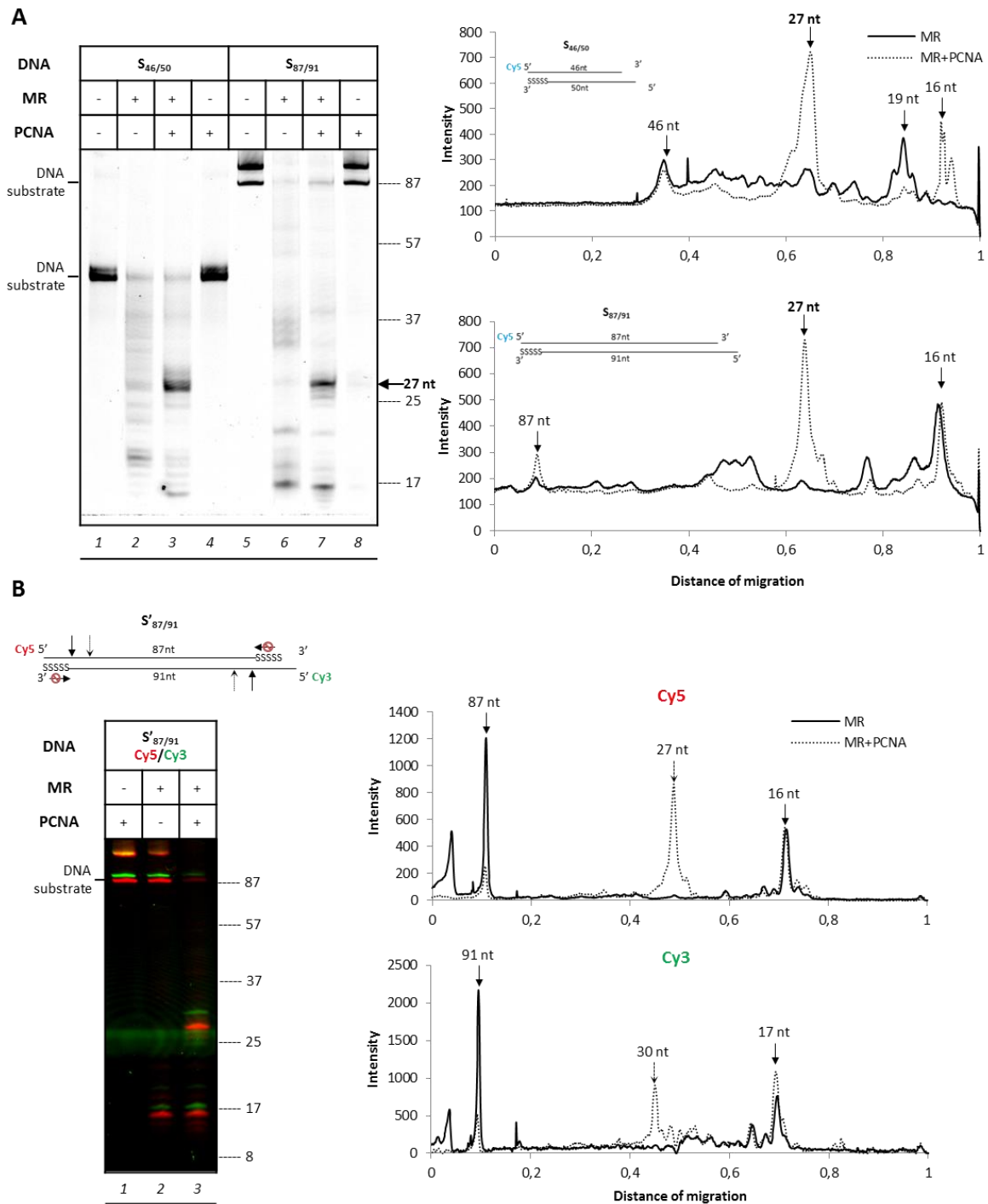
(D) Time course for DNA resection of the 5'-labeled substrate – control only with 200 nM PCNA (lane 23). Reactions included 5 nM of dsDNA S46/50 incubated with 50 nM MR complemented by 200 nM PCNA at 70°C for 90 min.

A time course of 5'-labeled substrate digestion indicated that the strand was resected rapidly as products were seen as early as 2 minutes after incubation (Figure 3.D). The digestion was complete after 90 min (lane 11) and we observed the accumulation of a major degradation product at about 19 nt. In presence of PCNA, we observed a shift in the size of the major product generated, at about 28 nt, and the slow accumulation of a second major product at about 27 nt (lane 13-22). When taken together, these results demonstrate that PCNA alters the nucleolytic pattern of MR complex. To confirm this result we used another dsDNA substrate (S87/91) that differed in length and sequence. The comparison of the nuclease activity of the MR complex in presence of PCNA clearly showed a similar shift on both substrates (Figure 4.A, compare lanes 2-3 and 6-7). The line charts on the right panel represents the degradation pattern as a plot of normalized migration distances versus labelled-DNA intensity. This graph clearly showed that, regardless of the size and sequence of the DNA substrates, PCNA restricted the nuclease activity of MR complex at the 5' end of a DNA break to generate a major 27 nt product and a minor product at about 16/17 nt. From the degradation pattern observed, it is tempting to speculate that this product occurred through endonucleolytic cleavage that might be promoted upon association with PCNA. This hypothesis was supported by a time course experiment using S87/91 oligonucleotide that showed the rapid appearance of the 27 nt product after 2 minutes of incubation (Figure S4), as also observed with the shorter oligonucleotide. However, at that point it was not possible to conclude whether PCNA had an effect only on the exo-, endo- or regulated both activities of the MR complex.

**Cleavage of the 5'-terminated DNA strand is promoted by PCNA/MR association.**

Hopkins *et al.* showed that both nucleolytic activities occur on the linear dsDNA *in vitro* (Hopkins & Paull, 2008) and both functions have a significant role *in vivo* (Shibata et al, 2013). To distinguish the effect of PCNA on these distinct activities, we tested the ability of MR to degrade a dsDNA substrate with phosphorothioates links at both 3' ends (S'87/91). As a consequence, 3'→5' exonuclease activity of Mre11 is inhibited on both strands of this substrate; at least a first endonucleolytic event is thus required to resect DNA ends. The substrate was labelled at its 5' ends with two different fluorophores (Cy5, Cy3) allowing a detection of reaction intermediates on both strands. DNA products were separated and revealed at two different wavelengths to superimpose Cy5 and Cy3 DNA products migration (Figure 4.B, left panel). Resection of S'87/91 by MR alone resulted in a well-defined pattern with a major product of 16/17 nt for Cy5 and Cy3 substrates. This result indicated that this 16/17 nt fragment, generated on S87/91 and S'87/91 substrates, arose from an endonucleolytic cut of MR complex at 16/17 nt from both 5' end (Figure 4.A and B, lanes 6 and 2, respectively). In presence of PCNA this small product was still present but the major observed products corresponded to larger fragments of 27 nt on the top strand and 30 nt on the complementary strand (Figure 4.B, lane 3), clearly indicating that these fragments were also produced by the endonuclease activity of MR complex and that, upon association with PCNA, the internal cleavage site is displaced a few bases 3' to the initial site. The difference in size of these products corresponded approximately to the length of the 4 nt 5'-overhang extremity of the complementary strand which suggest that PCNA could position at the blunt end and at the primer/template junction and promote an endonucleolytic cleavage in the 5' strands by MR complex at 27 nt from these positions.

Furthermore, the length difference (10-11 nt) between the two fragments approximately matches with the number of base pairs encircled by PCNA (Ivanov et al, 2006; McNally et al, 2010). Thus, we infer that the loading of PCNA/MR complex onto DNA ends causes displacement of the endonucleolytic cut. These results are in agreement with the mechanism by which the endonuclease activity of Mre11 acts to incise 5' strand DNA close to DSB ends (Cannavo & Cejka, 2014). Taken together, these data suggest that upon association with PCNA, MR could only exhibits endonucleolytic activity to process DNA ends.



**Figure 4. Cleavage of the 5'-terminated dsDNA strand is promoted by PCNA/MR interaction.**

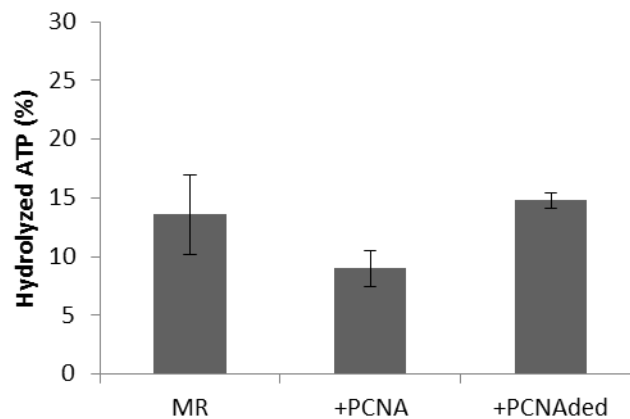
(A) Comparison of DNA resection by PCNA/MR complex for a short (S<sub>46/50</sub>) and a longer (S<sub>87/91</sub>) dsDNA substrate.

(B) Endonucleolytic cleavage of a long dsDNA substrate with 3' ends blocked by phosphorothiate bonds (S'<sub>87/91</sub>). The 5' ends were labelled by distinct dye Cy5 or Cy3 and both labelled products were superimposed in the electrophoretic migration gel. Dotted arrows indicate endonucleolytic cleavage promoted by PCNA.

Left panels: electrophoretic migration gels, right panels: resection pattern drawn as DNA intensity over electrophoretic migration distance. Reactions included 5 nM of dsDNA substrate incubated with 50 nM MR complemented by 200 nM PCNA at 70°C, 10 min.

**PCNA regulates ATPase activity of MR.**

As seen in Figure S3.B, digestion of dsDNA by MR complex was clearly ATP-dependent. Belonging to the ATP Binding Cassette (ABC) protein superfamily, Rad50 contain a conserved Nucleotide Binding Domain (NBD) that dimerizes upon two ATP molecules binding at dimer interface (Hopfner et al, 2000b). By binding and hydrolysing ATP, Rad50 drives dynamic structural transitions of the MR complex controlling Mre11 nuclease activities (Deshpande et al, 2014; Lammens et al, 2011; Lim et al, 2011; Majka et al, 2011; Mockel et al, 2012). We wondered whether the endonucleolytic activity is inherent to a specific ATP binding/hydrolysis cycle altered by PCNA. To examine the effect of the PCNA/MR complex interaction on ATPase activity we measured radioactive phosphate released by ATP hydrolysis. 5  $\mu$ M of S46/50 substrate were incubated at 65°C with 200 nM of MR complex and PCNA in presence of both metal ions ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) and an excess of ATP (2 mM). Interestingly, we observed a decrease of the rate of ATP hydrolysis at 1:2 MR:PCNA ratio when compared to the ATPase activity of MR complex alone or in presence with the non-trimerizable *PabPCNA*. (Figure 5). MR conformational states are tightly related to ATP binding/hydrolysis cycle. The ATP-bound form of MR occludes the Mre11 nuclease active sites leading to a “closed” conformation, while upon ATP hydrolysis the MR complex adopts an open configuration, promoting Mre11 nuclease activity. Here we showed that trimeric PCNA negatively regulates ATPase activity of MR. Following these data, it is tempting to speculate that PCNA maintains or even promotes the ATP-bound state of MR, closing off dsDNA access to cleavage sites.



**Figure 5. PCNA regulates ATPase activity of MR complex.**

Reaction included 2 mM ATP incubated at 65°C with 250 nM MR complemented when indicated by 0,5  $\mu$ M *Pfu*PCNA or 1  $\mu$ M *PabPCNA*DED in presence of 5  $\mu$ M dsDNA (S46/50).

## DISCUSSION

The MR complex is involved in various aspects of DSB repair, including sensing the DSB triggering signal pathways and facilitating DSB repair through different pathways. Among hyperthermophilic archaea, gene deletions of *mre11* and *rad50* are lethal for cell arguing for their apparent essentiality distinguishable HA from all other cellular organisms, including mesophilic archaea (review Grogan, 2015). Here we revealed *in vitro* a physical association and a functional interplay between the DNA clamp PCNA and the recombination MR complex of *P. furiosus*. To support this conclusion, we have found that (i) MR directly interacts with PCNA through a peptide in the C-terminal region of Mre11 (Figure 1-2), (ii) PCNA promotes cleavage of the 5'-terminated dsDNA but no 3' end resection (Figure 3-4), and (iii) PCNA negatively regulates ATPase activity of MR (Figure 5).

In the present study, we demonstrate that PCNA binds directly the Mre11-Rad50 complex of *P. furiosus*. Interaction appears to be mediated by the C-terminal region of Mre11. Mre11 proteins are composed of three structural domains, the capping and the nuclease domains form the core structure while the C-terminal region contains the Rad50 Binding Domain (RBD). RBD is connected to the capping domain by a flexible linker, which in the T4 system acts as an autoinhibitory element in the absence of Rad50 (Gao & Nelson, 2014). The section C-terminal from RBD corresponds to a disordered segment of 45 amino acids in *Pfu*Mre11. Interestingly, we identified a novel non-canonical PIP box in this C-ter segment of Mre11: [PK]-5X-[LI]-2X-W-[LIV]. The conspicuous difference between Mre11 motif and canonical PIP motif is the absence of the well conserved glutamine residue. Furthermore, the C-terminus Mre11 peptide (412-KKKRGTLDSWLGG-424) strongly competes for the binding of MR complex onto PCNA as well as another peptide from *P. abyssi* NucS corresponding to the canonical PIP motif (Figure 2.B). These results suggest that the peptide detected on Mre11 sequences is a variation on a theme of canonical PIP motif, lacking the otherwise conserved glutamine residue, and likely mediates the interaction between PCNA and MR complex. In several PCNA interacting partners, the PIP motif contains a glutamine residue involved in multiple interactions with PCNA surface residues (Gulbis et al, 1996). Recently, a number of additional proteins that bind to PCNA have been reported (reviewed in Gilljam et al, 2009; Moldovan et al, 2007; Pan et al, 2011; Pedley et al, 2014). Among them, few PCNA partners showed a PIP motif lacking this glutamine residue, and its absence has also been observed for homolog proteins, as RFC in Archaea (Warbrick, 2000). Interestingly, the N-terminal part of Mre11 peptide contains a basic region composed mainly by lysine (K) amino acids. As described for the RFC PIP motif of *P. furiosus*, these residues could establish electrostatic interactions with the negatively charged surface of the PCNA C-terminal tail (Matsumiya et al, 2001) and compensate for the absence of glutamine residue. The C-terminal part of the motif presents hydrophobic components (L and W) likely involved in the interaction with the hydrophobic pocket of PCNA buried under the IDCL. The C-terminal of Mre11 peptide does not hold an extended section like p21 which is responsible of interaction with the IDCL of PCNA (Gulbis et al,

1996). However important variation has been noticed at the extreme C-terminus of archaeal PCNA binding partners and little interaction is seen between the peptides and the PCNA IDCL (Winter & Bunting, 2012). In some proteins, and it may be the case for Mre11, regions immediately prior to the PIP motif appear to compensate for the lack of IDCL interactions. Another marked feature is the conservation of a proline residue at the N-terminal position of the motif.

Remarkably, the putative PCNA interacting motif is conserved among Mre11 sequences of all Thermococcales species and of *Archaeoglobus fulgidus*. Similar PCNA interaction motifs were not found in other archaea or in eukaryotic Mre11. Why this extension of Mre11 C-terminal domain is especially present in Thermococcale order is particularly intriguing. However a search of canonical PIP motif (Q-x(2)-[LIVM]-x(2)-[FYW]-[FYWLIVM]) in generic databases Uniprot and trEMBL (using Mre11 as description filter) identified Mre11 sequences from Methanosarcinaceae and Halobacteriales orders as potentially harbouring a PIP motif at the extreme C-terminus region. This suggests that the interaction between PCNA and MR complex could be a more general feature, not only restricted to these phylogenetic branches. In addition, proteins may use additional regions to interact with the DNA clamp and novel PCNA interacting motifs have been identified since the classical PIP-box discovery (Gilljam et al, 2009; Xu et al, 2001). In this context, this hypothesis deserves to be tested, particularly for eukaryotic Mre11 for which a co-localisation with PCNA was observed in human during S phase of the cell cycle (Maser et al, 2001).

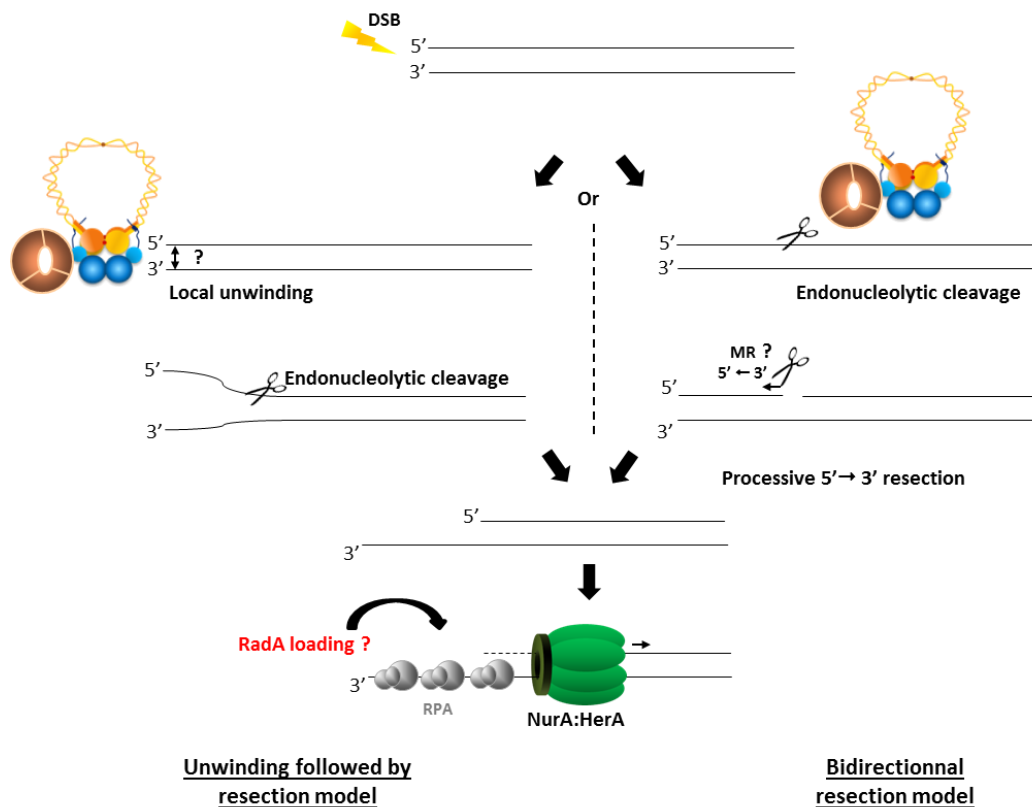
Besides the physical interaction, we described a functional interplay between the recombination complex and PCNA. Data indicate that MR functions to initiate DNA resection could be regulated by the DNA sliding clamp as its association with PCNA generates a major internal incision in 5' strand proximal to DSB ends, correlated with a decrease of ATP hydrolysis rate. Our finding of the dsDNA endonuclease activity promotion by PCNA is consistent with recent study in budding yeast, whereby a distinct MR complex partner, Sae2, influences the activity of MR in the same way by activating only endonuclease activity of the Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) complex (Cannavo & Cejka, 2014). Besides, it was shown that the 5' strand cleavage was strongly enhanced by a protein block mimicking a topoisomerase-like protein covalently bound. While MR nuclease activities are dispensable for the resection of "clean" DSBs (Llorente & Symington, 2004), endonuclease activity is well suited to clear obstructed DNA ends. Interestingly in the T4 phage system, the Mg<sup>2+</sup> dependent nuclease reaction of gp46/47 (MR homologs) is activated by two protein factors (gp32, UvsY) which also alter DNA product profile and ATP hydrolysis (Herdendorf et al, 2011). Mechanistically, it remains to be determined how nuclease and ATPase activities of MR are co-ordinately regulated by PCNA to ensure this internal incision. In the ATP-bound closed state, only ssDNA would be able to access to the active site of MR for endonucleolytic cleavage, however an ATP hydrolysis step is required to switch on both Mre11 endo- and exo-nuclease activities (Deshpande et al, 2014). Structural determination of the



PCNA/MR envelope with DNA would be important for understanding whether PCNA controls or binds a specific conformational state of MR.

As MR nuclease activities operate according to different mechanisms, the development of specific inhibitors has allowed unveiling of a two-step mechanism for resection during HR in eukaryote cells (Shibata et al, 2013), supported by *in vitro* experiments (Cannavo & Cejka, 2014; Garcia et al, 2011). Firstly, MRN/X acts to incise DNA proximal to DSB ends using its endonuclease activity followed by exonuclease activity digesting 3'→5' toward the DNA end (model discussed in Cejka, 2015; Paull, 2010). Astonishingly in our results, no 5'-product shorter than 15 nt was observed in nuclease assays, suggesting an absence of exonuclease digestion for the second step. As the eukaryotic MR complex was shown to stably unwind 15-20 base pairs at the end of duplex (Cannon et al, 2013; Paull & Gellert, 1999), the most likely explanation for this previous observation is that MR removed the 5' end through a combination of unwinding/endonucleolytic cut. Based on this bidirectional resection model, we assume that the short range processing by PCNA/MR would generate 3'-tailed substrate that could be suitable for additional partners responsible for extended resection. In the eukaryotic domain, the short 3'-ssDNA tails formed are then subjected to extensive resection executed *via* 5'→3' exonuclease activity of Exo1, or the action of Dna2 helicase/nuclease, working in conjunction with the Sgs1 helicase (recently reviewed Daley et al, 2015; Symington, 2014). Exo1 would act preferentially on dsDNA substrates with recessed 5' ends, analogous to the ends produced by MRX/Sae2 (Cannavo et al, 2013). In meiotic cells, Exo1 resects at least 350 nt, the minimal length required for homology search (Zakharyevich et al, 2010). In Archaea, no Exo1 functional homolog has been reported to date. Instead, the helicase/nuclease HerA/NurA complex was found in all thermophilic archaea, clustered in the operon encoding for Mre11 and Rad50 (Constantinesco et al, 2002). HerA and NurA form a complex where HerA drives the complex translocation along dsDNA while NurA unwinds and digests DNA (Blackwood et al, 2012; Rzechorzek et al, 2015). NurA was firstly described as an endo- and exo-nuclease with a 5'→3' polarity completing resection of the 5' strand initiated by Mre11 (Chae et al, 2012; Constantinesco et al, 2002). Recently, the HerA/NurA complex was shown to digest both 3' and 5' strands of DNA duplex (Blackwood et al, 2012). Interestingly, *in vitro* experiments demonstrated that Rad50, Mre11, HerA and NurA co-operate to resect the 5' strand at a DNA double-strand break, creating a 3' ssDNA suitable for the recombinase RadA (Hopkins & Paull, 2008). However, as NurA may also digest 3' strand, it remains structurally unclear how *in vivo* the 5' strand would be processed without cleaving 3' strand (Byrne et al, 2014). One other answer could be found in the interaction between NurA and SSB, where the single-stranded DNA-binding protein was shown to inhibit nuclease activities of NurA in *Sulfolobus tokodaii* (Wei et al, 2008). ssDNA-binding proteins exist as homotetramers (SSB) in bacteria and crenarchaea, whilst their homologue in eukaryotic and euryarchaeal are heterotrimers called Replication Protein A (RPA). In *Pyrococcus abyssi* we previously demonstrated that at least 20 nt were required to bind efficiently one RPA trimer onto DNA

(data not published). Here, the PCNA/MR interplay generates a 3' overhang of 25-30 nt suitable for RPA loading and thus for 3' tail protection from degradation by NurA, while the complex HerA/NurA could still extend 5' strand resection. Taken together, our findings indicate that *Pfu*MR interacts with *Pfu*PCNA physically and functionally in manner still consistent with end resection process for HR pathway. Based on the work described here and previous studies, we propose a model for the function of PCNA/MR, HerA/NurA and RPA in the processing of DNA ends (Figure 6).



**Figure 6. Two models for DSB ends resection by the PCNA/MR complex with their potential partners.**

This study leads to questions about the role of PCNA/MR interplay in hyperthermophilic archaea. In human cells and yeast, PCNA was shown to be associated with DSBs after DNA damage. Recently, the ring-shaped PCNA was identified promoting Exo1 damage association and thus enhancing extensive resection (Chen et al, 2015; Chen et al, 2013). In archaea, physical interactions with PCNA involving Holliday Junction (HJ)-resolving enzymes of *Pyrococcus furiosus* and *Sulfolobus solfataricus* were reported (Dorazi et al, 2006; Komori et al, 1999). These observations support a function of PCNA during recombination process. In another hand, MRN/X complex has also a primary role to recover stalled and broken replication forks in eukaryote cells (review Heyer et al, 2010; Stracker & Petrini, 2011) suggesting that recombination and replication are linked. The precise recruitment of the different process components either at DSB damage or at stalled replication fork

remains to be clarified. Among hyperthermophilic archaea, recombination genes such as *mre11*, *rad50*, *radA*, *herA*, and *nurA* have not permitted deletion (Fujikane et al, 2010; Huang et al, 2015; Zhang et al, 2013), supporting that HR pathway is essential for HA viability, may be to repair DNA damage caused by high temperature.

Here, our work unveiled a new PCNA-interaction motif specially conserved among Mre11 sequences of Thermococcale species which all are hyperthermophilic archaea. Strikingly, this sequence is also conserved in Hel308 (also known as Hjm), a helicase involved in replication fork restart (Fujikane et al, 2005). Thus, through protein-protein interaction or hand-off mechanism, PCNA may introduce these enzymes at a stalled replication fork and regulate their activities. However, deciphering the role of PCNA/MR interplay in HA awaits further studies, with the hope that it might provide clues to understand the recombination process at the replication fork.

## MATERIALS & METHODS

### Proteins and peptides

Gene coding for *P. furiosus* PCNA was inserted into pET19b to add an N-terminal 10xHis-tag (plasmid provided by B. Connolly, Emptage et al, 2008) and expressed in *Escherichia coli* Rosetta pLysS. Non trimeric form of *P. abyssi* PCNA (*PabPCNA*Aded) was expressed from pET26b+ in *E. coli* Rosetta pLysS as described (Rouillon et al, 2007). *P. furiosus* Mre11-Rad50 (MR) complex was coexpressed from a bicistronic pET27b vector (gift from J. Tainer and T. Paull, Hopfner et al, 2000a) in BL21 DE3 codonplus *E. coli* adding a 6xHis-tag at the N-terminal region of Mre11.

Cells were grown at 37°C to an OD<sub>600</sub> 0.7-0.8, and expression was induced by addition of 1 mM IPTG (final concentration). Four hours after induction, cells were harvested by centrifugation and re-suspended in a buffer containing (i) for PCNA proteins: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM DTT, (ii) for MR complex: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM DTT supplemented by an EDTA-free protease inhibitor (Roche). Cells were lysed by applying 1.9 kbar pressure (One shot, Constant Systems) and were sonicated. PCNA and MR supernatants were incubated overnight with DNase I at 37°C and then heated at 75-80°C for 20 min while MR supernatant was incubated at 70°C for 15 min. Soluble fractions were loaded onto a nickel resin column HisPrepFF 16/10 (GE Healthcare) excepted mutant PCNA which had no His-tag. After a wash step, proteins were resolved with a linear gradient from 10 mM to 500 mM imidazole. Peak fractions were run on 15% SDS-PAGE gels (Bio-Rad), pooled and concentrated using Vivaspinn columns (10 or 30 MWCO) before running on a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare). PCNA proteins were eluted in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM DTT and the MR complex in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT complemented with 20% glycerol and stored at -20°C. Proteins were quantitated using DC protein assay (BioRad) for PCNA and absorbance measurement at 280 nm for MR complex. All molar concentrations indicated in this study corresponded to the homotrimeric PCNA and to the heterotetrameric form of M<sub>2</sub>R<sub>2</sub> complex.

Peptides used as competitor for PCNA-binding in pull-down assays were synthesized and purified (>90% purity) by Geneprep. PIP-like Mre11 peptide derived from *Pfu*Mre11 sequence (412-424): Ac-KKKRGTLDSWLGG-NH<sub>2</sub>. PIP NucS peptide derived from *Pab*NucS protein (239-251), an endonuclease interacting with *Pab*PCNA (Creze et al, 2012): Ac-KRSKQKTLDFFTP-NH<sub>2</sub>. Peptide used as negative control (PIP-) was characterized by (Meslet-Cladiere et al, 2007): Ac-KEVKEEYKRFLEE-NH<sub>2</sub>.

### Co-immunoprecipitation experiments

To study the physical interaction between PCNA and Mre11-Rad50, 8.33 µg of anti-*Pab*PCNA polyclonal antibody was immobilized onto 1.5 mg of magnetic Dynabeads Protein A (Life Technology). Subsequently, antibodies were covalently anchored using 57 µg of BS3 crosslinker

(Thermo Scientific); such an amount of beads was determined in order to specifically bind 1 µg of PCNA input (data not shown). In 20 µl reaction, 1 µg PCNA was incubated 30 min at 4°C with 10 µg MR complex in binding buffer (25 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.05 % Tween 20). The resulting protein complexes were trapped by anti-PCNA Dynabeads 10 min at 4°C. Beads were washed 3 times with binding buffer (100 µl) before final elution 10 min at 95°C in denaturing XT loading buffer (BioRad). Proteins were then separated on SDS-PAGE (4-20 % Pierce) and visualized using coomassie blue dye. Pull-down assays for the three MR constructs were performed following the same procedure, with the exception of protein complexes were formed during 1 hr at 4°C and incubated with the bead-antibody complexes for 5 min at 4°C and then washed 3 times at 25°C. A molar ratio of 1:3 for PCNA:MR proteins was used. As input control, 1 µg per protein was loaded onto SDS-PAGE gel.

For competitive assays anti-PCNA antibodies were not covalently attached to the support in order to efficiently rescue all PCNA input (data not shown). In 20 µl reaction, 1 µg PCNA was incubated with 100 molar excess of competitor peptide at least 1 hr at 4°C in previous binding buffer. Then, 10 µg MR complex were added to the PCNA/peptide solution for 5 min at 4°C. The resulting protein complexes were trapped by anti-PCNA Dynabeads, washed 3 times with 50 µl binding buffer at 4°C and eluted as described above. After SDS-PAGE separation, proteins were transferred onto a PVDF membrane (Thermo Scientific). PCNA and Mre11 were altogether probed using a common anti-His monoclonal antibody (Invitrogen). Proteins were revealed by immunofluorescence using ECL 2 blot kit (Thermo). Image acquisition was done with ChemiDoc XRS+ (BioRad). Quantifications were carried out using QuantityOne software (BioRad).

### **SPR experiments**

Data were obtained using a Reichert SR7000DC spectrometer instrument (Reichert Inc., Buffalo, NY). The running buffer was 25 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.05 % Tween 20, and the flow rate was 25 µl/min. *Pfu*PCNA was immobilized on a mixed self-assembled monolayer (10 % C<sub>11</sub>-(OEG)<sub>6</sub>-COOH: 90 % C<sub>11</sub>-(OEG)<sub>3</sub>-OH), Reichert Inc.) *via* classical amine coupling chemistry and the chip was stabilized after a serie/set of 3 x 30 s injection of 100 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Each curve displayed was double referenced with a set of timely closed blank buffer injections. For the peptide interaction, a concentration range from 0.37 µM to 30 µM of peptide were injected on the *Pfu*PCNA chip at 25°C. Data were then fitted using a global analysis method with Scrubber 2.0a software (Biologic Software, Australia).

### **DNA substrates**

Oligonucleotides were purchased from Eurogentec and were purified by RP-HPLC for S46/50 and by PAGE for S87/90. With a primer:template ratio of 1:1, dsDNA substrates were annealed in presence

of 10 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl by heating to 85°C for 5 min and cooling to room temperature. Labeled dsDNA substrates were constructed with the following sequences:

S46/50: 5'Cy5-CTGCAGGGTTTTTGTTCAGTCTGTAGCACTGTGTAAGACAGGCCA-3' / 5'-CATCTGGCCTG-TCTTACACAGTGCTACAGACTGGAACAAAAACC-CsTsGsCsAsG-3'.

S87/91: 5'Cy5-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGA-TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA-3'/5'-CATCTGCCAAGCTTGCATG-CCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTsTsCsCsTsG-3'.

S'87/91:5'Cy5-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGA-TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTsTsGsGsCsA-3'/5'Cy3- CATCTGCCAAGCT-TGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTsTsCsCsTsG-3'.

Phosphorothiate bonds are indicated by “s” between nucleotides.

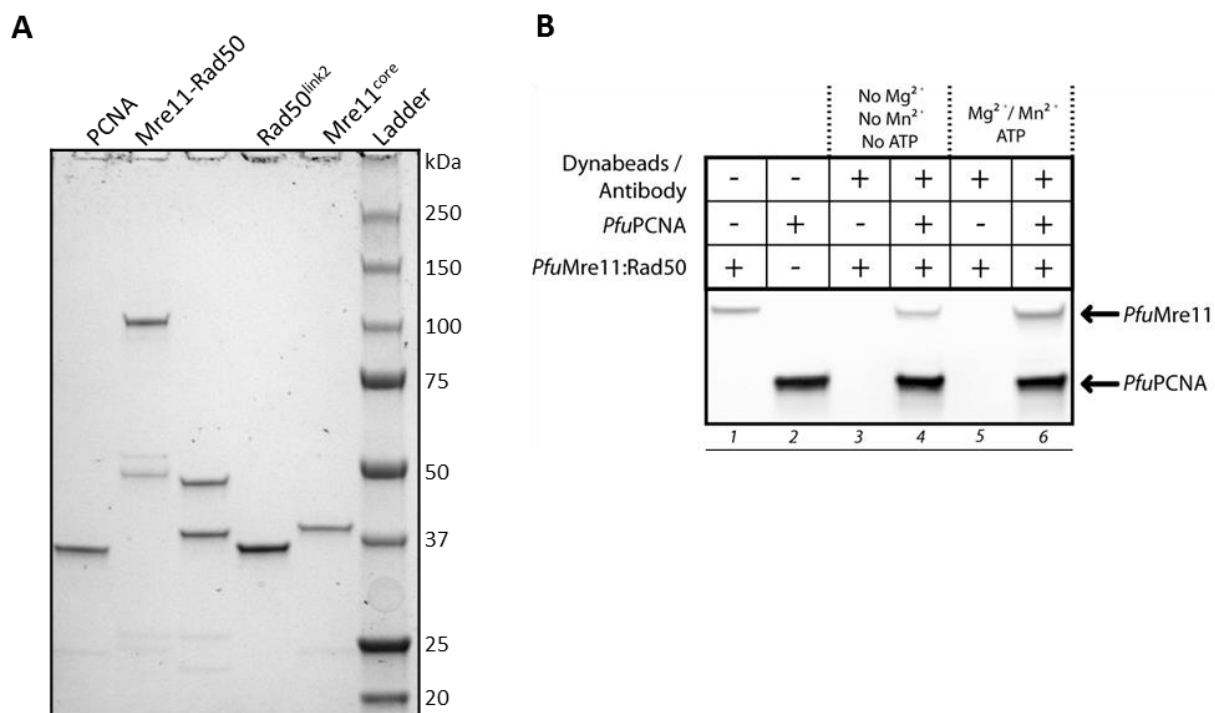
### **Nuclease assays**

Resection of linear dsDNA substrates by nuclease activities of MR complex was followed in 10 µl reactions containing 5 nM DNA in 25 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA complemented by 5 mM ATP and 5 mM MgCl<sub>2</sub>/MnCl<sub>2</sub>. Pre-incubation was performed with 50 nM of MR complex and various PCNA concentrations at 25°C for 2 min followed by an incubation with DNA solution at 70°C for varying lengths of time as indicated in figures. Reactions were stopped by addition of 85% deionised formamide, 0.01 N NaOH, 10 mM EDTA and by heating samples at 100°C for 5 min. DNA products were separated by electrophoresis on a gel composed of 15% or 18% polyacrylamide 19:1, 7 M urea, 16% deionised formamide and 1X Tris Borate EDTA (TBE). Labeled fragments were analysed with fluorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) and quantified with Image Quant software.

### **ATPase assays**

Pre-incubation of 200 nM MR and PCNA at indicated concentrations was performed at 25°C for 2 min to form the complex. Proteins were then incubated at 65°C in 15 µl buffer containing 25 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>/MnCl<sub>2</sub> and 5 µM dsDNA S46/50 for 10 min before adding 2 mM ATP and ATP γ32P (62.5 nCi/µl). Two microliters of reaction solution were collected at various time points and spotted on TLC plates (PEI-cellulose, Nagel). ATP, ADP and Pi were separated by TLC (Thin Layer Chromatography) using 250 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Products were analysed by autoradiography and level of Pi generated was quantified by MultiGauge (Version 3.0) software to quantify ATPase activity. Three independent experiments were performed to measure ATPase activities.

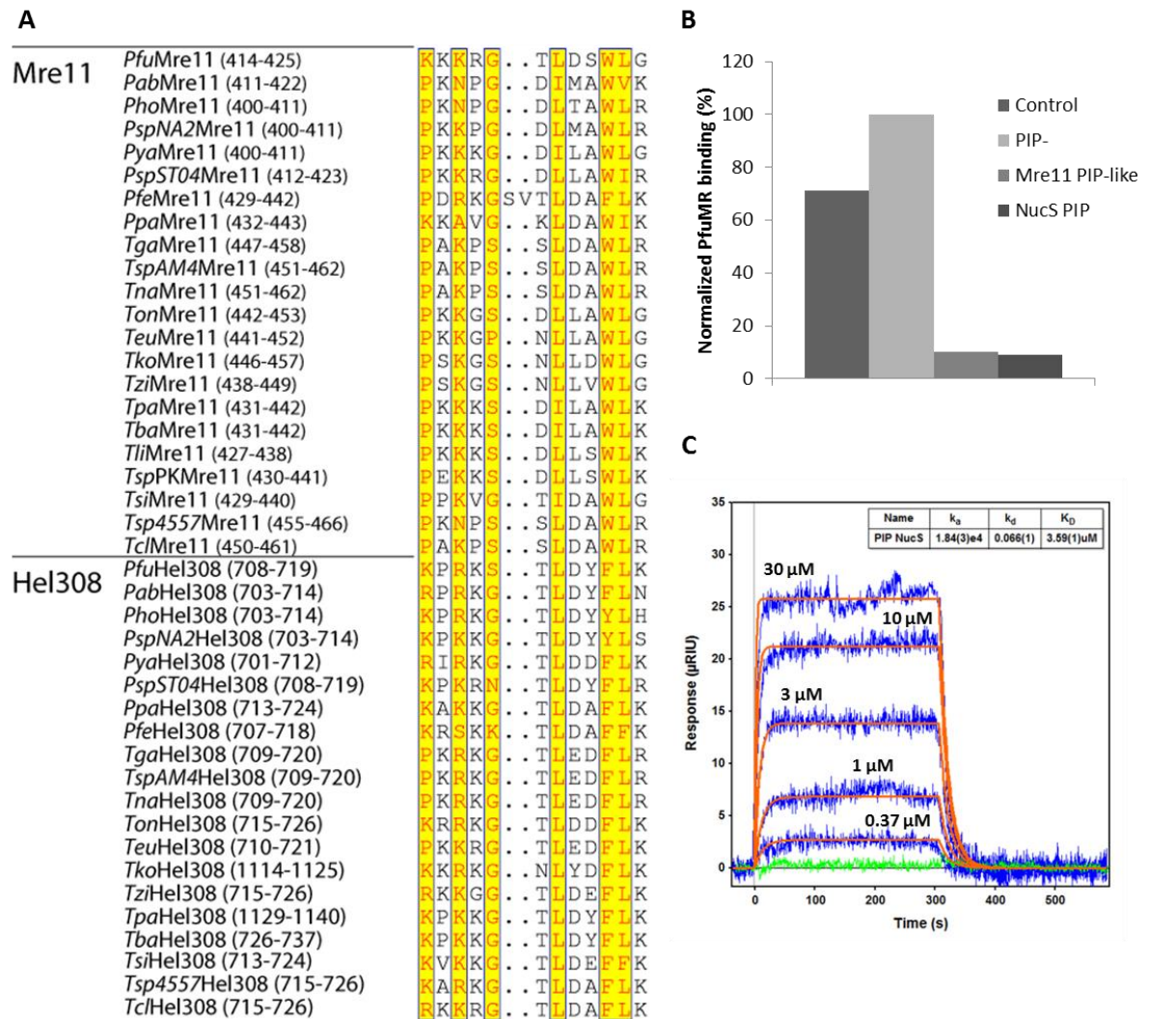
SUPPLEMENTAL DATA



**Figure S1.**

(A) Protein gel of purified recombinant *P. furiosus* PCNA, Mre11-Rad50, and truncated constructs of Mre11 and Rad50 – 1 µg of protein run on 15% SDS-PAGE gels as indicated. Migration of molecular weight marker is indicated. Gel was stained with Blue Coomassie stain.

(B) PCNA/MR interaction persists in enzymatic buffering conditions - target control (lane 1), input control (lane 2), pull down negative control and co-immunoprecipitation assay in reference buffer (lanes 3-4) and enzymatic buffer (lanes 5-6).



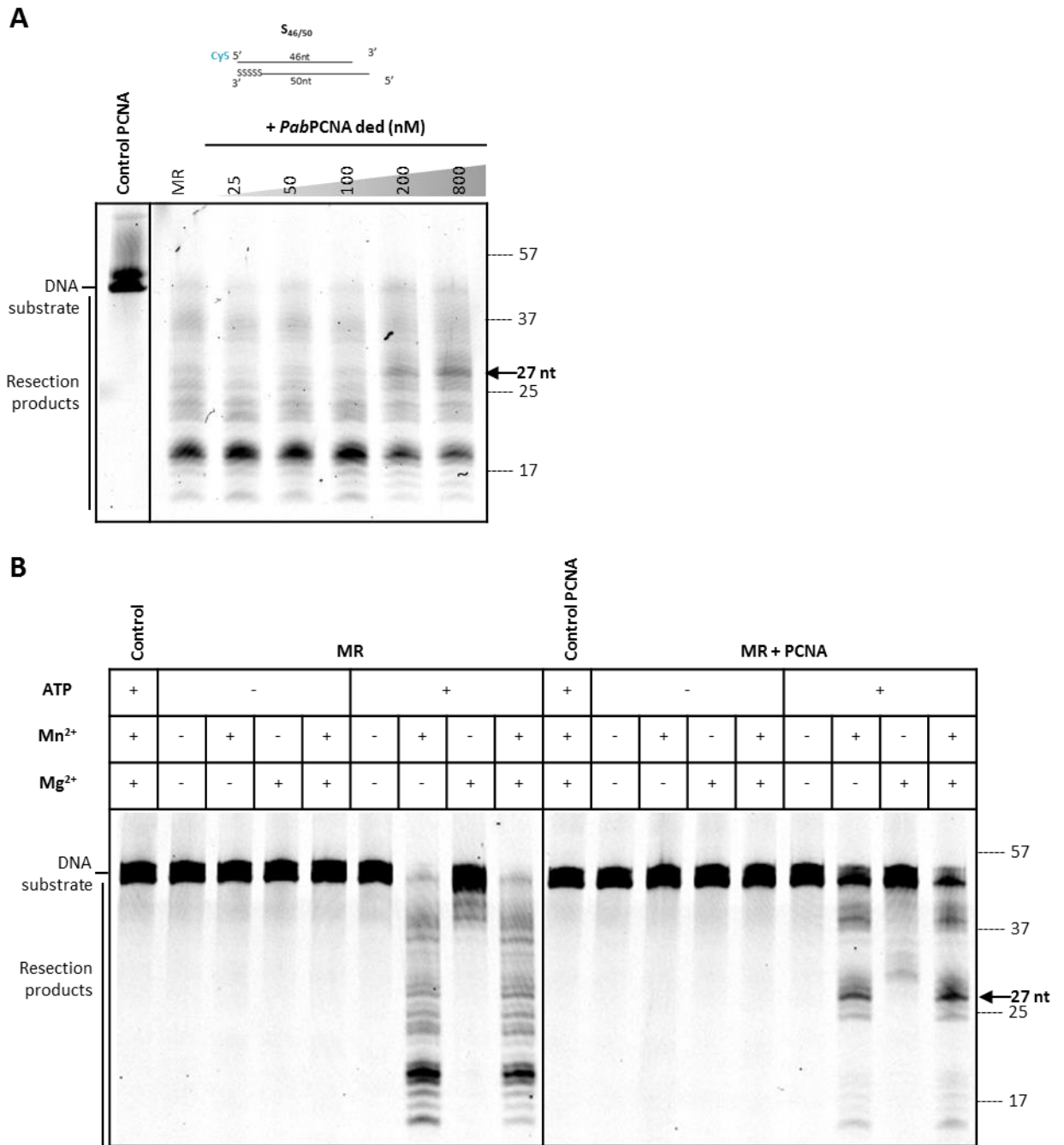
**Figure S2.**

(A) PIP-like motif found in Mre11 and Hel308 proteins among Thermococcales. Alignment of C-terminal domains from archaeal proteins using ScanProsite (detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins) with the pattern [PK]-x-[KRNA]-x(3,5)-[IL]-x-[SAVD]-[WF]-[ILV] as anchor.

(B) Both PIP-like Mre11 peptide and PIP NucS peptide compete for loading onto PCNA – Rad50 signal from competitive co-immunoprecipitation assays was quantitated and normalized with corresponding signals obtained along with a peptide control.

(C) Surface plasmon sensogram for binding of *PabNucS* PIP peptide (239-KRSKQKTLDFFTP-251) to PCNA for a concentration range from 0.37  $\mu$ M to 30  $\mu$ M of peptide.



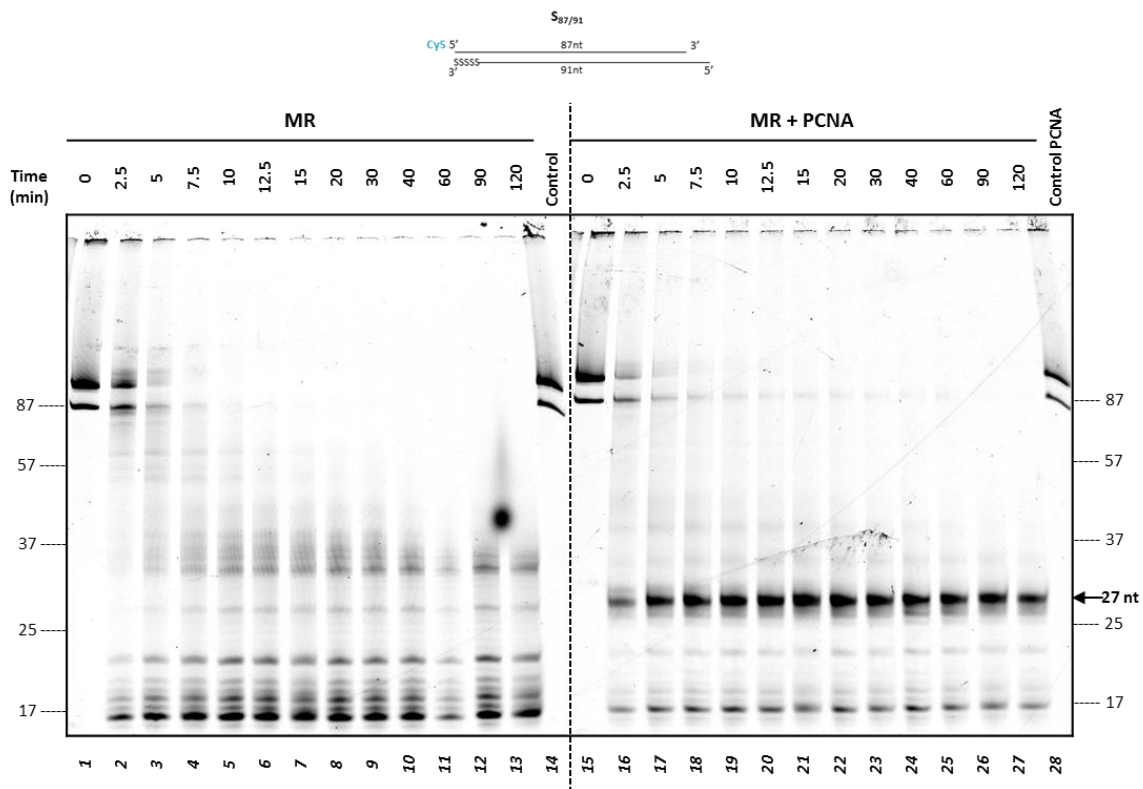


**Figure S3.**

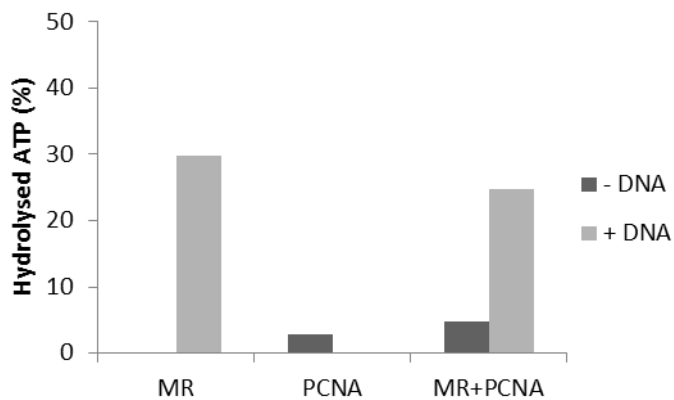
(A) *In vitro* DNA end resection activities of MR complex with increased concentrations of *PabPCNA*ded (left panel) or *PabPCNA* (right panel) - control with 0 nM MR and 200 nM *PabPCNA*ded or *PabPCNA*.

(B) MR nuclease activities are ATP and Mn<sup>2+</sup> dependent even in presence of PCNA.

Reaction included 5 nM dsDNA (*S46/50*) incubated 10 min at 70°C with 50 nM MR, 200 nM PCNA complemented by 1 mM ATP and 5 mM MgCl<sub>2</sub>/MnCl<sub>2</sub>.



**Figure S4. Time course for DNA resection of the 5'-labeled substrate S87/91** – control without protein (lane 14), reaction included 10 nM of dsDNA incubated at 70°C with 20 nM MR (lanes 1-13) complemented by 80 nM PCNA (lanes 15-27), control only with PCNA (lane 28).



**Figure S5. DNA is required to detect ATPase activity of MR complex** – control represents ATP hydrolysis without protein. Reaction included 2 mM ATP incubated at 65°C with 250 nM MR complemented when indicated by 1 μM PCNA in presence or absence of 5 μM dsDNA (S46/50).

## IV. INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

En complément des données présentées dans l'article, des expériences supplémentaires ont été menées pour aller plus loin dans la compréhension de l'interaction fonctionnelle entre PCNA et le complexe MR. Nous avons pu avancer jusque là que la formation probable d'un complexe PCNA/MR privilégiait la formation d'une coupure endonucléolytique à proximité de l'extrémité 5' de la cassure. Seulement, le mécanisme d'interaction et le mode opératoire restent encore à approfondir. Les résultats présentés ci-dessous, sont pour certains encore préliminaires mais apportent un plus ou soulèvent de nouvelles questions quant au rôle de cette interaction.

### 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### a) PROTÉINES

Les constructions des protéines recombinantes utilisées lors de cette étude sont résumées dans le tableau ci-dessous. Les protocoles concernant l'expression et la purification des protéines : *Pfu*PCNA, *Pab*PCNA(ded) et *Pfu*Mre11-Rad50 sont précisés dans la partie « Materials & methods » de l'article. Seul PCNA de *P. abyssi* ne figure pas dans l'article car ayant été utilisé dans un premier temps pour explorer l'interaction fonctionnelle des partenaires, voici sa procédure de purification.

Le gène *Pab*PCNA a été inséré dans le vecteur pQE-80L avec en position N terminal, une étiquette de six histidines. La souche *E. coli* BL21 codon+RIL a été transformée avec cette construction avant d'être cultivée à 37 °C dans un milieu LB (Luria Bertani, Beckton, Dickinson and Co). La production de la protéine a été induite durant la phase exponentielle de croissance, à une DO<sub>600</sub> (Densité Optique à 600 nm) de 0,6 par l'ajout de 1 mM IPTG puis incubé de nouveau à 37°C pendant 4 h. Après centrifugation, le culot cellulaire a été repris dans une solution contenant 50mM Tris-HCl, pH7,5, 0,1 mM EDTA, 2 mM β-mercaptoéthanol, supplémentée par un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Complete, EDTA-free, Roche) ; passé au One shot, un broyeur cellulaire ; chauffé 10 min à 80 °C ; centrifugé 45 min à 9500 G. Le surnageant a été filtré à travers un filtre de 0,22 µm avant d'être déposé sur une colonne d'affinité de nickel (Hiprep 16/10 QFF, GE Healthcare), puis élué par un gradient d'imidazole de 0 à 500 mM. Les fractions contenant la protéine ont été rassemblées et dialysées sur la nuit à 4 °C dans le tampon : 50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,2 mM EDTA puis conservé à -20 °C.

PCNA étant une protéine ne contenant pas de tryptophane, un dosage colorimétrique a été privilégié par rapport au dosage par absorbance. La concentration de la protéine purifiée a donc été mesurée en utilisant le réactif de Bradford ou de Lowry ayant tout deux une bonne sensibilité et une réactivité avec d'autres résidus que le tryptophane. Une vérification du spectre d'absorbance à 260 nm était réalisé pour déterminer une contamination potentielle en ADN. Dans le cas du complexe *Pfu*Mre11-Rad50, la concentration a été calculée à partir de l'absorbance du complexe à 280 nm. Les concentrations de

chacune des protéines employées sont exprimées en molarité en tenant compte de la formation du trimère de PCNA et du tétramère de Mre11-Rad50.

**Tableau 7. Construction des protéines recombinantes.**

Protéine	Vecteur	Souche <i>E. coli</i>	His-tag	Antibiotique	Référence
<b><i>PabPCNA</i></b>	pQE-80L	BL21 codon+RIL	6xHis	Ampicilline / Chloramphénicol	Meslet-Cladiere et al, 2007
<b><i>PfuPCNA</i></b>	pET19b	Rosetta pLysS	10xHis	Ampicilline / Chloramphénicol	Emptage et al, 2008
<b><i>PabPCNA (ded)</i></b>	pET26b+	Rosetta pLysS	X	Kanamycine / Chloramphénicol	Rouillon et al, 2007
<b><i>PfuMre11-Rad50</i></b>	pET27b	Rosetta pLysS	6xHis	Kanamycine / Chloramphénicol	Hopfner et al, 2000a

### ***b) FIXATION À L'ADN***

Des expériences de gel retard autrement appelé EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) ont été menées pour analyser la fixation du complexe MR sur l'ADN. Pour cela, 10 µl de réaction contenait 5 nM de substrat ADN  $S_{46/50}$  dans 25 mM HEPES pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA, 0,1% triton 100X. Dans le cas des essais en présence de PCNA, les partenaires protéiques étaient pré-incubés 2 min à 25°C avant d'être ajouté à la solution d'ADN et d'être incubé 10 min à 50°C. Suivant les essais, les co-facteurs du complexe MR, ATP/Mn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> étaient ajoutés en complément dans le milieu réactionnel comme indiqué dans les légendes des figures concernées. Les échantillons étaient ensuite chargés avec 10% de ficoll dans un gel d'agarose 1%. Les produits de cette incubation ont été résolus par électrophorèse dans du tampon TBE 1X à 34 mA durant 1h30. Le substrat ADN était ensuite révélé par fluorescence par l'instrument Typhoon 9400 (GE Healthcare).

### ***c) EXPÉRIENCES DE RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (SPR)***

La SPR est une méthode par détection optique capable de suivre en temps réel une association biologique entre deux partenaires protéiques (le principe méthodologique est disponible en annexe).

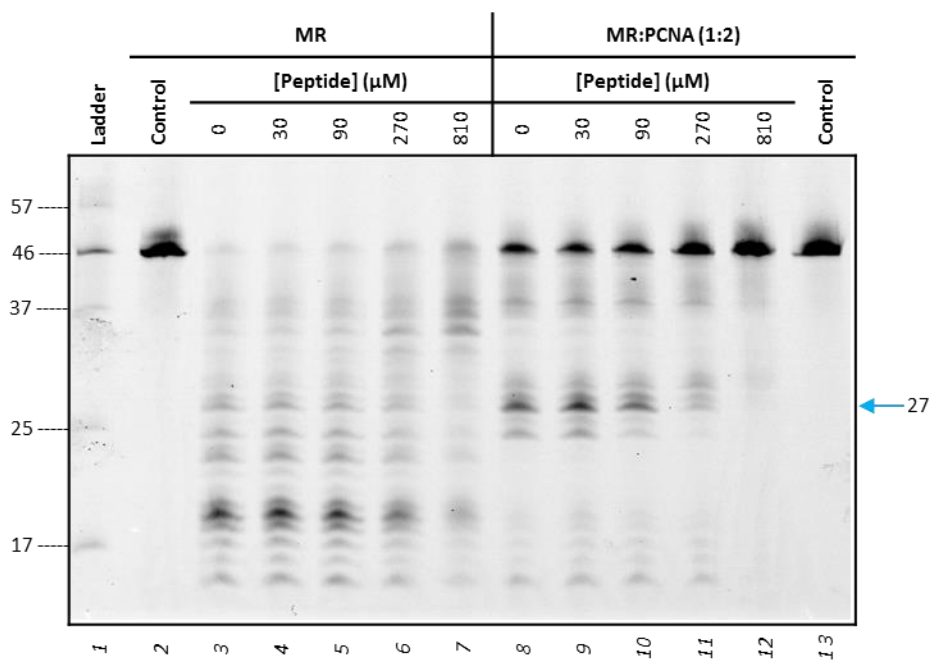
Les acquisitions ont été menées à 25°C avec l'appareil Reichert SR7000DC (Reichert inc., Buffalo, NY). Le tampon de course à un débit constant de 25 µl/min contenait 25 mM HEPES pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT et 0,05 % Tween 20. La sonde, *PfuPCNA* a été immobilisée de manière non orientée à la surface d'une monocouche (10 % C<sub>11</sub>-(OEG)<sub>6</sub>-COOH: 90 % C<sub>11</sub>-(OEG)<sub>3</sub>-OH), Reichert Inc.) grâce à un couplage chimique des amines primaires. Puis une série d'injection de 100 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (3 x 30 s) a stabilisé la surface de la puce. À l'issue de cette étape, le signal récupéré correspondant au

taux d'immobilisation du PCNA était de 1520  $\mu$ RIU (unité de résonance). Cette même puce a été exploitée pour l'ensemble des acquisitions présentées dans ce chapitre. Les données des acquisitions ont été traitées avec un double référencement permettant de corriger les signaux à partir des mesures réalisées sur des blancs (injection de tampon). Elles ont ensuite été analysées pour modélisation à partir du logiciel Scrubber 2.0a (Biologic Software, Australia). Les deux types d'analyses suivantes ont été menées grâce à cette approche : affinité du peptide de *PfuMre11* (« Article ») et l'association du complexe *PfuMR* (« Résultats supplémentaires »).

## 2. RÉSULTATS

### a) EFFET DU PEPTIDE DE MRE11 SUR L'INTERACTION FONCTIONNELLE

Comme nous avons pu le démontrer précédemment, la séquence C-terminale de Mre11 est en partie responsable de l'association du complexe MR avec PCNA. Le peptide identifié, Mre11 PIP-like, interagit à la surface du PCNA avec une affinité de 4,05  $\mu\text{M}$  ( $K_D$ ). Par des expériences de co-immunoprécipitation nous avons confirmé la compétition entre ce peptide et le complexe MR pour la fixation au PCNA. L'objectif ensuite était d'analyser l'effet de ce peptide sur l'interaction fonctionnelle des deux partenaires. Si le peptide se fixe au PCNA à la place du complexe MR, il devrait être possible de mieux discerner l'influence du PCNA seul par rapport à l'association PCNA/MR. Pour cela, des concentrations saturantes en peptide ont été pré-incubées avec PCNA avant d'y incorporer le complexe MR. Des contrôles ont été réalisés pour mesurer l'effet du peptide seul sur l'action du complexe MR (Figure 27, pistes 4 à 7). L'ajout en concentration croissante de peptide dans la réaction MR:PCNA abolit graduellement l'activité de MR (Figure 27, pistes 8 à 12) sans montrer un retour à un profil spécifique du complexe MR seul. Ce résultat suggère fortement une compétition entre PCNA et MR pour opérer sur l'ADN lorsque ces deux partenaires ne sont plus associés et PCNA étant en quantité supérieure inhibe la résection de l'ADN.



**Figure 27. Action du peptide de Mre11 sur l'interaction fonctionnelle PCNA/MR.**

Le peptide Mre11 PIP-like a été pré-incubé à différentes concentrations avec 200 nM *Pfu*PCNA avant d'être ajouté à la solution d'ADN contenant 10 nM  $S_{46/50}$ , 1 mM ATP et 5 mM  $\text{MnCl}_2/\text{MgCl}_2$ . La réaction était déclenchée par l'addition du complexe MR (100 nM) suivi par une incubation à 70°C de 10 min. Les échantillons de contrôle contenaient la solution d'ADN avec 810  $\mu\text{M}$  de peptide mais sans protéine (piste 2) ou uniquement PCNA à 200 nM (piste 13).

### ***b) UNE INTERACTION PHYSIQUE STABILISÉE PAR L'ATP/MG<sup>2+</sup>***

Pour aller plus loin dans la caractérisation physique de l'interaction PCNA/MR, des données d'association et de dissociation du complexe PCNA/MR ont été acquises en temps réel à 25°C par la technique de SPR (*Surface Plasmon Resonance*). Immobilisé chimiquement sur une surface, PCNA présente de façon aléatoire ses différentes faces au partenaire injecté à débit constant dans le flux de matière. Dans les sensorgrammes présentés ci-dessous, les ordonnées représentent la variation du signal optique en unité de résonance (signe d'une variation de quantité de matière) et en abscisse le temps d'acquisition après injection du complexe MR.

#### **✦ Association et dissociation du complexe MR au PCNA**

À partir de l'injection du complexe MR, deux événements biologiques principaux sont observés: l'association et la dissociation du complexe MR au PCNA. En Figure 28.A, l'augmentation du signal durant les 400 premières secondes correspond à une variation positive de la quantité de matière présente à la surface de la puce traduisant ainsi une fixation des protéines MR au PCNA. Sa diminution en fin d'injection traduit une perte de matière et donc un décrochage du complexe MR. Il est intéressant de visualiser ici une dissociation en deux étapes au moins : une première rapide (décrochage rapide de MR) et une seconde plus lente après 500 s. Cette seconde phase de dissociation paraît encore plus lente pour le complexe entier MR suggérant que la partie manquante de Rad50 stabiliserait l'interaction avec PCNA. Nous aurons l'occasion de revenir sur cette hypothèse un peu plus loin après s'être intéressé à la dynamique de l'interaction en présence des co-facteurs de MR.

#### **✦ Des co-facteurs qui stabilisent l'interaction.**

Pour son bon fonctionnement enzymatique, le complexe MR requiert la présence d'ATP, de manganèse et de magnésium comme nous avons pu le voir lors des essais nucléases. L'ensemble des essais d'interaction fonctionnelle ayant été réalisé dans ces conditions, l'objectif ici était de caractériser l'association physique dans ces mêmes conditions, excepté pour la température. Nous avons mené une série d'acquisition en injectant le complexe MR ayant été pré-incubé avec ses co-facteurs : ATP, MnCl<sub>2</sub> et MgCl<sub>2</sub> (Figure 28.B). Pour les quatre conditions testées, les courbes du sensorgramme ont des formes similaires en phase d'association mais les phases de dissociation illustrent une différence de comportement significative des protéines :

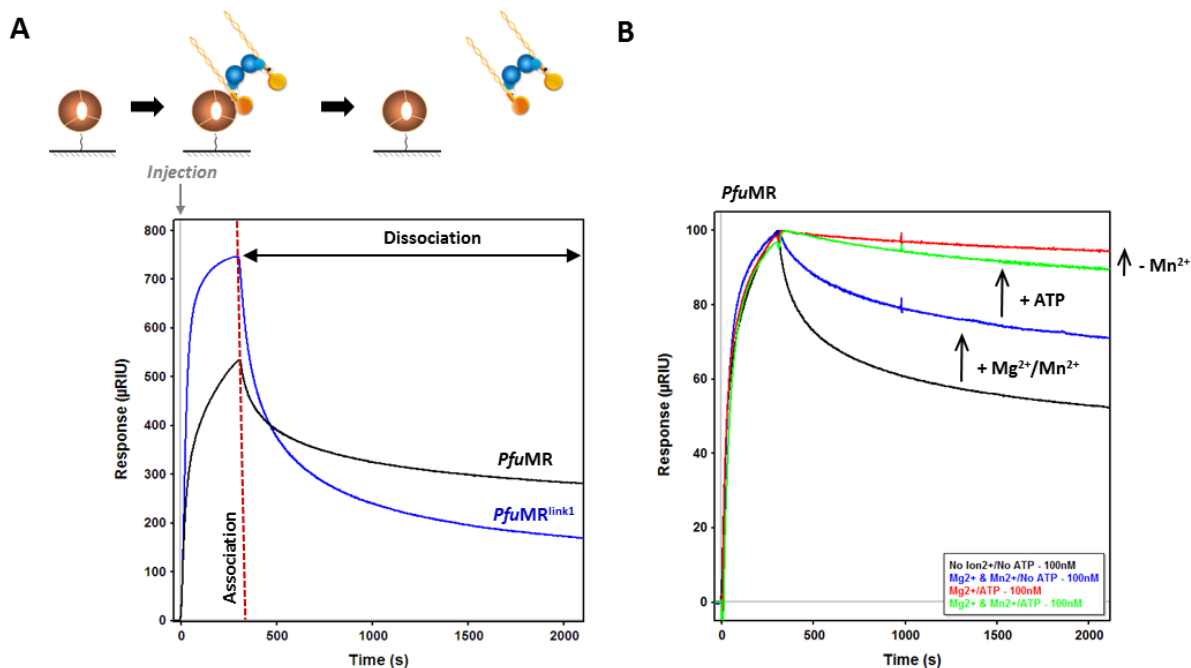
Ajout des ions métalliques Mg<sup>2+</sup> et Mn<sup>2+</sup> (courbe bleue) : la phase de dissociation est bien plus lente comparé à la condition sans ion (courbe noire), signe qu'une quantité plus importante de MR reste fixée au PCNA. Deux phénomènes peuvent expliquer cela : (i) l'augmentation de la force ionique du milieu favorise les interactions stabilisant le complexe MR/PCNA, (ii) l'occupation des sites dédiés aux ions métalliques induit un changement conformationnel du complexe MR.

Ajout de l'ATP en plus des ions (courbe verte) : phénomène de stabilisation du complexe PCNA/MR accentué. À 25°C, nous avons donc bien la confirmation qu'un complexe PCNA/MR stable dans le temps, se forme et ceci dans les conditions réactionnelles des essais enzymatiques.

Ajout de l'ATP avec  $Mg^{2+}$  uniquement (courbe rouge) : parmi les quatre conditions, c'est celle-ci qui génère le complexe PCNA/MR le plus stable.

Dans le cas de la condition ATP/ $Mg^{2+}$ , nous avons pu démontrer que ce changement de comportement était répétable sur au moins trois acquisitions indépendantes. Comme nous avons pu le voir durant les essais nucléases, l'ATP est une molécule essentielle à l'activité nucléase de MR sur ADNdb. La coordination des molécules d'ATP par Rad50 nécessite la présence des ions métalliques et de préférence  $Mg^{2+}$ . Il est aujourd'hui bien défini que l'ATP est à l'origine d'une transition conformationnelle du complexe MR comme discuté en introduction de ce chapitre. Au vu de nos données, il est probable que ces changements de conformation soient responsables d'une modification des propriétés de l'association PCNA/MR. Cette hypothèse est appuyée par la modélisation des courbes obtenues dont la procédure est proposée en Annexe 5.





**Figure 28. Acquisition en temps réel de l'association du complexe *PfuMR* avec *PfuPCNA*.**

(A) Comparaison de la stabilité de l'interaction PCNA/MR entre les deux versions du complexe MR. Au temps  $t=0$  s, 100 nM de complexe MR sont injectés à débit constant. L'augmentation du signal durant la phase d'association confirme la fixation de la protéine d'intérêt au PCNA. En fin d'injection (droite en pointillés rouges), du tampon de course circule en continu. La phase de dissociation du complexe *PfuMR* est bien plus lente que sa version tronquée *PfuMR<sup>link1</sup>* signe d'un complexe PCNA/MR plus stable. (B) Effet des co-facteurs de MR sur la stabilité de son interaction avec PCNA. En noir, interaction en absence de co-facteurs de 100 nM *PfuMR* avec *PfuPCNA* immobilisé – en bleu, ajout de 5 mM  $MgCl_2/MnCl_2$  à l'injection contenant *PfuMR* – en vert, ajout de 5 mM d'ATP en plus des ions métalliques – en rouge, ajout de 5 mM d'ATP/ $MgCl_2$  à l'injection contenant *PfuMR*. Cette dernière condition est celle qui permet la formation du complexe PCNA/MR le plus stable. Les acquisitions ont été réalisées à 25°C pour un débit constant de 25 µl/min. Les courbes en (A) ont été obtenues au second cycle d'injection tandis que les courbes en (B) sont les acquisitions dès la première injection. Les courbes en (B) ont été normalisées en fin de phase d'association pour une meilleure lecture.

### *c) FIXATION OU MOBILITÉ DU COMPLEXE PCNA/MR SUR L'ADN ?*

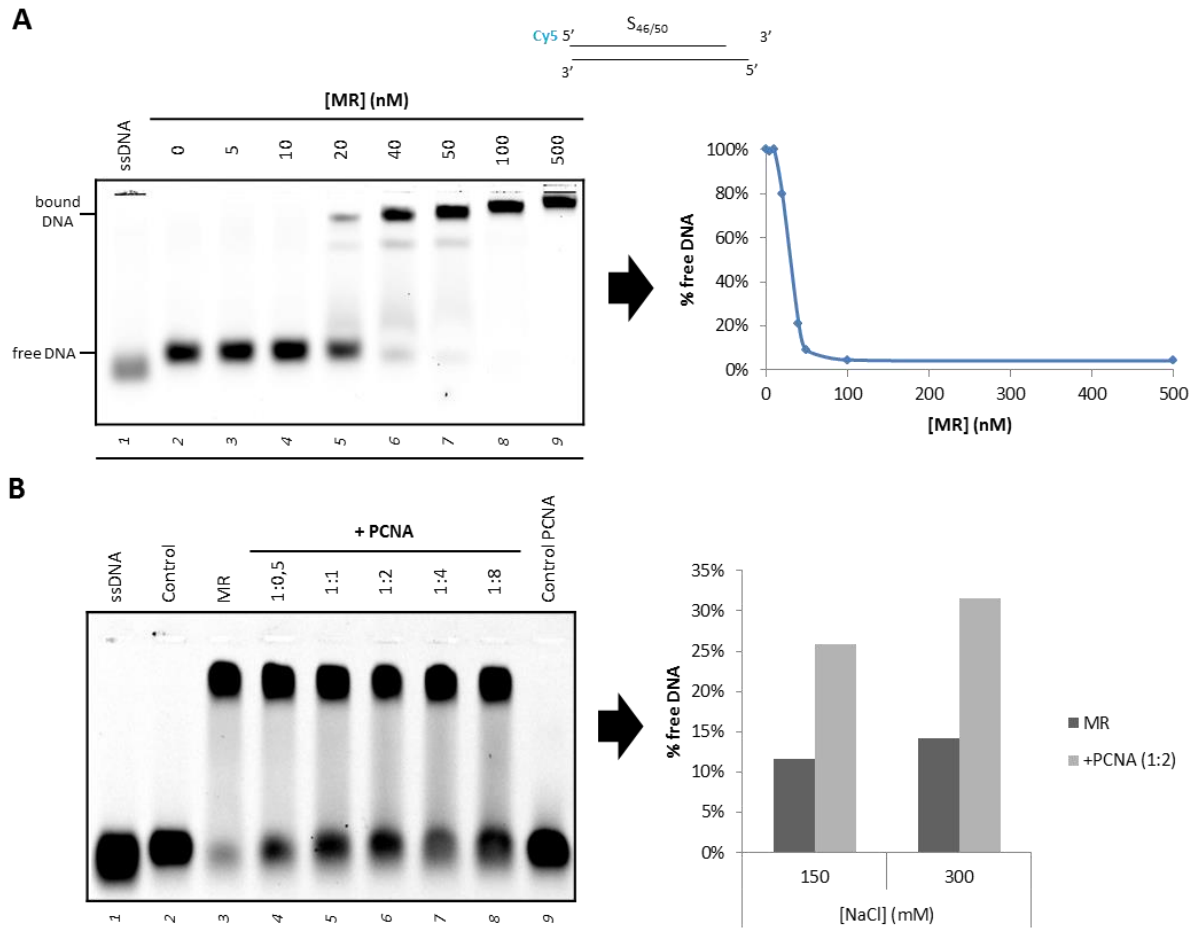
Un autre aspect de l'association a été exploré : la capacité de fixation des protéines à l'ADN. Comparé à une plateforme de recrutement pour ses partenaires, je me suis demandé si PCNA n'agissait pas de même avec le complexe MR en améliorant son affinité à l'ADN. Afin d'analyser cela, des expériences de gel retard ont été réalisées sur l'ADNdb linéaire S<sub>46/50</sub> à 50°C. Lorsque la protéine se fixe au substrat marqué, le poids moléculaire du complexe formé est plus élevé que l'ADN seul et va donc migrer plus lentement lors de l'électrophorèse. Pour une gamme de concentration en complexe MR, un retard de migration est observé à partir de 20 nM de tétramère (Figure 29, piste 5). Pour un ratio molaire de 1 :10 comme celui utilisé lors des essais nucléase, c'est plus de 90% du substrat ADN qui est fixé par MR (piste 7). À des concentrations plus élevées, le retard visualisé est encore plus important, suggérant la présence de plusieurs complexes MR sur l'ADN (piste 9).

D'après les données obtenues par SPR, la présence des co-facteurs ATP/Mg<sup>2+</sup> favorise la formation d'un complexe PCNA/MR stable à 25°C. Dans la Figure 29.B, nous constatons que la présence du PCNA avec MR augmente le taux d'ADN libre de près de 10 % et cela quelque soit la quantité de PCNA ajoutée (pistes 3 à 8). L'observation est la même dans des conditions de salinité plus élevée (300 mM). La condition à 300 mM NaCl avait été expérimentée dans le cadre d'une observation lors d'essai nucléase, nous reviendrons juste après. Contrairement à ce qui était attendu, il semblerait que PCNA réduise les événements de fixation de MR à l'ADN. Leur association régulerait-elle l'accès de PCNA/MR à l'ADN ?

Il est à noter que lors de ces essais nous n'avons pu visualiser une fixation du PCNA sur l'ADN et cela même à de plus fortes concentrations (Figure 29.B, piste 9). Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où PCNA encercle l'ADN et lorsqu'il s'agit d'un ADN linéaire il va s'enfiler le long du double brin et se décrocher aux extrémités. Des acquisitions de SPR sur puce ADN ont démontré le chargement de l'anneau sur un ADNdb linéaire (48/75nt) (donnée interne). Ici, la technique du gel retard n'est pas adaptée à la dynamique du système car seule la fixation de MR est observée même en présence de PCNA (pas de retard de migration supplémentaire). Toutefois, sachant que PCNA se charge effectivement sur ce type d'ADN, le phénomène constaté avec MR pourrait suggérer un enfilement du complexe PCNA/MR le long du substrat ADN aboutissant à son décrochage. Cette expérience serait à répéter, car il est surprenant de ne pas observer un accroissement du taux d'ADN libre en fonction de la quantité de PCNA ajoutée, à moins que le complexe PCNA/MR ne fonctionne que dans des conditions stoechiométriques.

Autre bémol de la méthode, en cas du chargement du complexe MR/PCNA sur l'ADN, nous ne pouvons affirmer la présence du PCNA à moins d'observer un retard supplémentaire. Il serait intéressant de marquer PCNA avec un fluorochrome en plus de l'ADN pour voir si MR favorise le maintien du PCNA sur l'ADN. Mais si c'est l'inverse qui se produit comme discuté précédemment,

cette approche ne serait pas adaptée et il faudrait se tourner vers d'autres techniques telles que la SPR ou l'anisotropie de fluorescence pour observer ce phénomène en temps réel ou à l'équilibre.



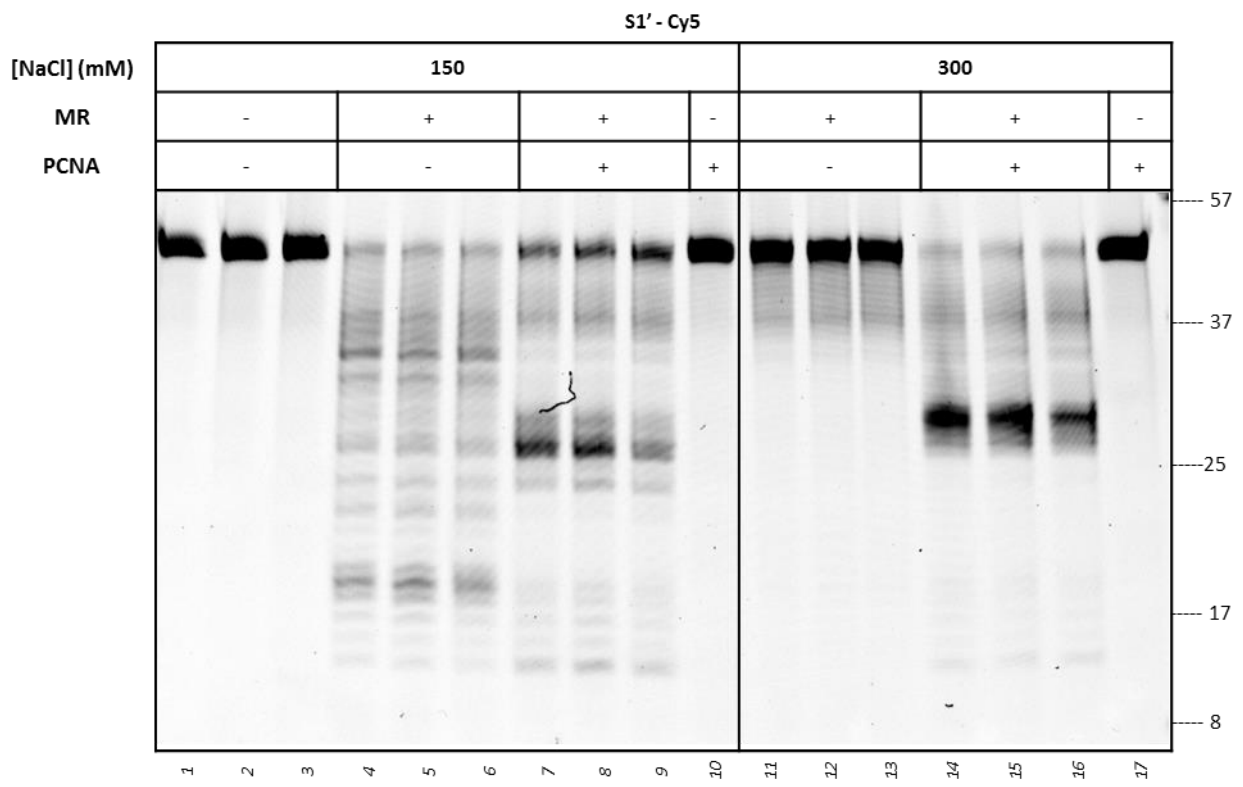
**Figure 29. Affinité du complexe MR et PCNA/MR pour l'ADN.**

(A) Affinité du complexe *PfuMR* pour l'ADNdb linéaire S<sub>46/50</sub> à 5 nM. À gauche, gel retard après électrophorèse, à droite, graphique représentant le pourcentage d'ADN libre restant en fonction de la concentration en complexe MR.

(B) La présence du PCNA augmente le pourcentage d'ADN libre restant après incubation sur un ADNdb linéaire. Les protéines (100 nM MR et 50, 100, 200, 400, 800 nM PCNA) ont été pré-incubées avec 1 mM ATP et 5 mM MnCl<sub>2</sub> avant d'être incorporés à la solution d'ADN S<sub>46/50</sub> à 10 nM. À gauche, gel retard pour l'expérience réalisée à 150 mM en NaCl, à droite, graphique illustrant l'ADN libre restant après incubation avec 100 nM MR et 200 nM de PCNA dans un tampon à 150 et 300 mM NaCl - *ssDNA* (piste 1) correspond au brin de 46 nt marqué au Cy5 - l'essai *Control* (piste 2) contenait le substrat S<sub>46/50</sub> mais sans protéine - l'échantillon *Control PCNA* (piste 9) avait la même quantité de PCNA que l'essai en 8 (800 nM) incubé avec l'ADN mais sans complexe MR.

#### d) CAS D'UNE STIMULATION DU COMPLEXE MR PAR PCNA.

Lors des essais nucléases l'augmentation de la force ionique de la solution s'est révélée inhiber totalement l'action nucléase du complexe MR (Figure 30, pistes 11 à 13). Mais de façon surprenante l'ajout de PCNA dans le milieu a activé significativement les fonctions nucléases de MR (pistes 14 à 16). La similarité des fragments générés à 300 mM NaCl (28 nt) suggère fortement encore une fois qu'il s'agit d'une coupure endonucléolytique. L'augmentation de la salinité d'une solution favorise les interactions hydrophobes. Ici, dans une solution tampon à pH 7,0, les protéines sont toutes deux chargées négativement. Au vu de ces résultats, il est possible que pour des concentrations plus importantes en NaCl, les ions apportés réduisent les capacités de fixation de la protéine à l'ADN et que PCNA aide au chargement du complexe sur l'ADN. Toutefois les résultats obtenus par gel retard ci-dessus n'ont pas dévoilé une incapacité de fixation à l'ADN du complexe MR dans un tampon à 300 mM NaCl. La raison de cette observation semblerait avoir une autre origine. L'accès au site actif de MR pourrait être gêné par la présence additionnelle de ces ions salins et son interaction avec PCNA favoriserait de nouveau cet accès. Les données recueillies pour le moment ne permettent pas d'en savoir plus à ce sujet.



**Figure 30. PCNA active la fonction nucléase de MR dans des conditions de salinité élevée.**

Réaction avec 5 nM  $S_{46/50}'$  incubé 10 min à 70°C en présence de 50 nM MR et 200 nM *Pfu*PCNA dans un tampon réactionnel à 150 ou 300 mM en NaCl. Les essais réactionnels ont été réalisés en triplicat.

## V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Sans revenir en détails sur la discussion de l'article, cette partie inclue les résultats majeurs obtenus sur l'interaction PCNA/MR ainsi que les hypothèses qui en découlent. Nous discuterons ici plus ouvertement des pistes de recherche pour aller plus loin dans la compréhension de la mécanique physique et fonctionnelle de ce partenariat, tout en s'intéressant à son implication physiologique pour les cellules qu'elles soient procaryotes ou eucaryotes.

### 1. D'UNE ASSOCIATION PHYSIQUE,

#### ✦ Un nouveau motif d'interaction au PCNA ?

À travers cette étude nous avons défini un nouveau motif d'interaction au PCNA, appelé Mre11 PIP-like car proche du PIP-motif canonique. De façon intéressante le motif identifié est particulièrement bien conservé parmi les protéines Mre11 de Thermococcales et plus ponctuellement chez une Archeoglobale. La recherche de ce motif nous a aussi conduits à l'identification du PIP-motif canonique dans les régions C-terminales des séquences Mre11 de Methanosarcinales et de Halobacterales. Il est envisageable que la surface du PCNA évolue suivant les espèces et que cette évolution soit concomittente au sein d'une espèce. Cependant, chez *P. furiosus* les protéines telles que RFC et Fen-1 possèdent bien le PIP-motif. Il est difficile d'expliquer l'origine de ce motif et sa répartition parmi les différentes espèces d'archées mais les différences de motifs pourraient être un moyen de réguler les interactions du PCNA avec ses nombreux partenaires.

La conservation de résidus dans ce motif suggère leur importance dans l'interaction avec PCNA. Pour confirmer que le peptide interagit dans la même région du PCNA que le PIP-motif, une analyse structurale du PCNA en interaction avec le peptide Mre11 PIP-like est envisagée. La détermination structurale à haute résolution permettrait d'identifier les acides aminés principalement impliqués dans cette interaction, pour d'une part affiner le motif d'interaction et d'autre part réaliser de la mutagénèse dirigée sur Mre11 en vue d'études fonctionnelles.

#### ✦ Une interaction PCNA/MR conservée ?

Concernant les eucaryotes, un motif similaire (PIP-motif ou PIP-like) n'a pas été décelé dans les séquences codant pour les éléments du complexe MRN/MRX. Mais comme dit précédemment, il existe une variabilité des motifs d'interaction au PCNA (APIM motif, Gilljam et al, 2009) qui semble encore plus prononcée chez les eucaryotes où la complexité des mécanismes renforce les besoins en systèmes de régulation. De plus un troisième élément (Xrs2, Nbs1) est étroitement lié à Mre11 et Rad50 chez les eucaryotes et régule les actions du complexe. Cela n'exclue donc pas une interaction du complexe de la recombinaison avec PCNA comme pourrait le laisser suggérer la co-localisation cellulaire de ces protéines chez l'humain (Maser et al, 2001).

Par des essais de co-immunoprécipitation entre les protéines recombinantes de différentes espèces il serait possible de vérifier si cette interaction PCNA/MR peut effectivement avoir lieu, peut-être *via* un motif d'interaction différent.

✦ **Comment s'assemble le complexe MR au trimère de PCNA ? avec quelle stoechiométrie ?**

Des données structurales viendront prochainement compléter cette étude grâce à une collaboration avec Gareth Williams du laboratoire de John Tainer au Scripps Research Institute à Berkeley. Ce laboratoire travaille sur le complexe Mre11-Rad50 de *P. furiosus* dont ils ont pu déterminer plusieurs structures en SAXS et aux rayons-X (Deshpande et al, 2014; Williams et al, 2011; Williams et al, 2008).

Les objectifs sont de déterminer dans un premier temps la stoechiométrie du complexe PCNA/MR en solution par la technique de MALLS (Multi-Angles Laser Light Scattering) permettant de connaître à la fois le poids moléculaire du complexe et sa taille. Car une question majeure non élucidée lors de cette étude est la stoechiométrie de l'interaction : combien de molécules de MR peuvent interagir avec PCNA. L'anneau assemblant trois unités de PCNA, trois sites de fixation peuvent accueillir Mre11. Le complexe MR, sous forme d'un tétramère  $M_2R_2$ , peut interagir avec deux unités de PCNA. Pratiquement, un encombrement stérique est très probablement occasionné par la fixation d'un tétramère de la taille de MR (300 kDa) et la mécanique de fixation peut générer des changements de conformation des deux partenaires.

Puis par SAXS (Small Angle X-rays Scattering), microscopie électronique et cristallographie aux rayons X, il tentera d'obtenir une première structure du complexe PCNA/MR. Ceci donnerait l'enveloppe moléculaire du complexe formé qui permettrait de modéliser l'assemblage des éléments Mre11, Rad50 et PCNA. Ensemble ces données permettront de mieux comprendre l'organisation de ces deux partenaires et pourront fournir des informations exploitables dans les essais fonctionnels.

✦ **Une interaction PCNA/Mre11 ?**

Le motif d'interaction au PCNA se situe dans la région C-terminale de Mre11 mais lors des essais de co-immunoprécipitation nous ne disposons pas de la protéine Mre11 seule complète. Nous ne savons donc pas si Mre11 en dehors du complexe MR est capable de se lier au PCNA. Une étude *in vivo* chez *Sulfolobus acidocaldarius* suggère que la protéine Mre11 soit impliquée dans la détection de lésion ADN (Quaiser et al, 2008). Cependant l'enzyme Mre11 est retorse à produire, en cause sa région C-terminale désordonnée qui provoque sa précipitation en solution lorsqu'elle n'est pas complexée avec Rad50. Une co-expression de Mre11 avec PCNA pourrait stabiliser la protéine Mre11 *via* la fixation de son extrémité C-terminale au PCNA. Étudier leur fonctionnalité *in vitro* nous informerait sur les capacités de ce duo à opérer sur l'ADN et de lui proposer une fonction *in vivo*.

## 2. À L'INTERACTION FONCTIONNELLE.

### ✦ PCNA peut-il exercer une contrainte sur la conformation du complexe MR ?

Le complexe MR est à lui seul un complexe dynamique, en solution trois conformations de MR seraient présentes dont le pourcentage dépend de la présence du couple ATP/Mg<sup>2+</sup>. Les données biophysiques obtenues par SPR combinées aux résultats enzymatiques amènent à penser que PCNA favorise l'activité endonucléase du complexe MR en interagissant préférentiellement avec sa forme fermée. Cependant la mécanique de cette interactions dans l'alternance des activités enzymatiques de MR reste encore indéterminée surtout que les cations Mn<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> pourraient avoir un rôle régulateur additionnel.

Par SPR, la validation du modèle proposé précédemment est en cours pour déterminer la constante d'équilibre de dissociation du complexe à une température se rapprochant des conditions physiologiques. Connaître ces valeurs, c'est pouvoir réaliser les essais enzymatiques dans des conditions favorisant l'interaction. Mais pour suivre le changement conformationnel de MR en présence du PCNA et des co-facteurs en solution il faudrait imaginer une approche en fluorescence telle que le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ; en greffant à des positions judicieuses (déterminé après résolution de l'organisation spatiale du complexe) deux fluorophores qui nous permettront de mesurer les mouvements et modifications que subit le complexe MR lors de son association avec le PCNA.

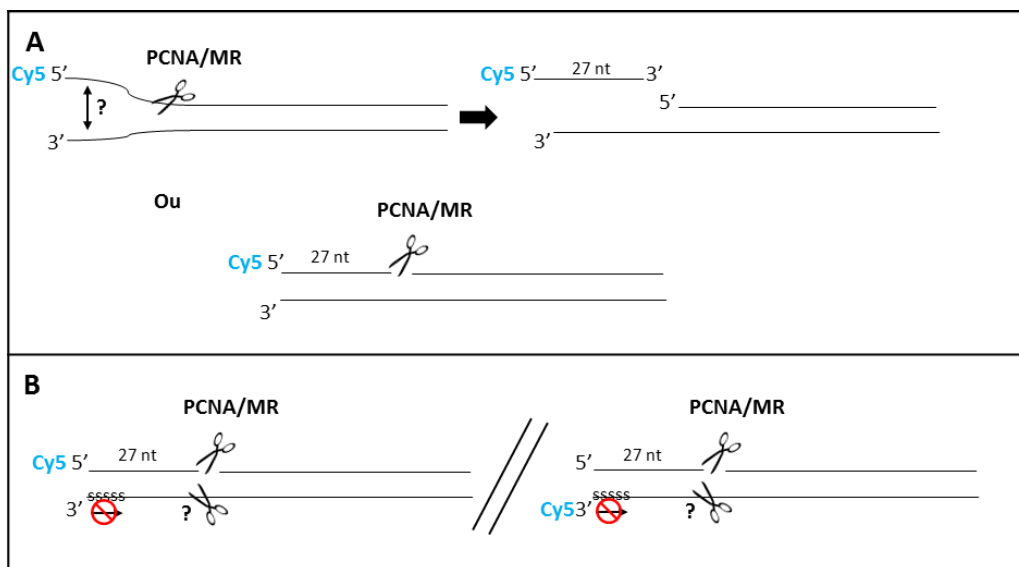
### ✦ L'action du complexe PCNA/MR génère t-elle une extrémité sortante 3' ?

La question se pose sur la fonctionnalité du partenariat PCNA/MR. Les résultats obtenus par les essais enzymatiques suggèrent que PCNA pourrait promouvoir l'activité endonucléase de MR pour cliver le brin 5' au niveau de l'extrémité double brin. Des observations similaires ont été réalisées avec des facteurs protéiques autres que PCNA chez le phage T4 (Herdendorf et al, 2011).

Chez la levure, l'incision serait suivie d'une activité exonucléase 3'→5' du complexe MRX pour terminer de dégradation l'extrémité 5' (Cannavo & Cejka, 2014). Cependant dans nos essais nucléases, aucun fragment de taille inférieure à 10 nt n'ont été produits suggérant l'absence d'une dégradation additionnelle par la fonction 3'→5' exonucléase de MR. Le complexe eucaryote MRN est capable d'ouvrir une extrémité double brin sur 15 à 20 nucléotides (Cannon et al, 2013). Si cette ouverture est suivie d'une coupure endonucléolytique il est possible que l'activité exonucléase additionnelle ne soit pas requise. Si nous avons pu démontrer que le complexe PCNA/MR génèrait une coupure située à 27 nt de l'extrémité 5', il nous reste à déterminer si cette coupure est couplée à une ouverture de l'ADNdb pour déshybrider le fragment généré, engendrant une extrémité 3' simple brin.

Pour cela les produits réactionnels d'un essai nucléase seront déposés sur gel natif, ceci permettra de vérifier que le fragment 5'-Cy5 de 27 nt est bien coupé et dégagé du substrat initial (Figure 31.A).

Dernièrement, il a été montré que pour de faible concentration, l'homologue bactérien SbcCD, privilégiait son activité endonucléase pour cliver de façon binaire les extrémités des longs substrats ADN (Lim et al, 2015). Pour nous assurer que l'extrémité 3' ne subit pas une activité endonucléase au niveau de la cassure double brin, un second test nucléase consistera à utiliser un substrat ADN doublement marqué aux extrémités 3' et 5' (Figure 31.B). Couplé au test précédent, l'analyse des produits de dégradation marqués en 3' devrait en plus nous permettre de connaître la longueur exacte du simple brin 3' généré par l'action du complexe, extrémité qui est nécessaire pour la suite du processus.



**Figure 31. Illustration d'essais nucléases à réaliser pour, (A) s'assurer que le fragment de 27 nt visualisé au cours des essais correspond à de l'ADN simple brin et (B) contrôler que l'extrémité 3' n'est pas clivée.**

#### ✦ Le complexe PCNA/MR peut-il se déplacer de long de l'ADN ?

Chez les eucaryotes, un anneau de chargement du complexe MRN a été identifié, du nom de Rad17, cette protéine serait une ATPase qui interagirait avec l'unité Nbs1 du complexe. *Via* cette interaction, il recruterait très vite le complexe de la recombinaison au niveau du site de l'ADN endommagé (Paull & Lee, 2014; Wang et al, 2014).

Lors de notre étude, très peu de données ont été obtenues concernant un éventuel recrutement du complexe MR par PCNA car la technique des gels retard n'était pas adaptée pour visualiser le chargement du PCNA sur l'ADN. Afin de déterminer l'affinité du complexe pour l'ADN mais aussi pour tenter de visualiser un éventuel déplacement du complexe sur l'ADN, une approche par



anisotropie ou *quenching* de fluorescence serait à envisager. Pour cette expérience, il serait intéressant d'utiliser la condition ATP/Mg<sup>2+</sup> pour laquelle l'interaction des partenaires est stable et l'activité nucléase de Mre11 réduite. Si les partenaires sont capables d'évoluer ensemble sur l'ADN, cela suggérerait une progression commune dans des processus telle que la réplication.

### 3. POUR QUEL RÔLE CHEZ LES ARCHÉES ?

#### ✦ L'incision réalisée par le duo PCNA/MR peut-elle constituer une porte d'entrée dans l'ADN à proximité de cassure double brin ?

Comme Sae2 chez la levure, PCNA favorise la coupure interne d'un brin d'ADN du côté 5' de l'extrémité. Cette incision a un rôle déterminant dans l'initiation du processus de recombinaison lorsque les extrémités sont bloquées par des adduits protéiques (Andres et al, 2014). Pour compléter cette caractérisation, il pourrait donc être intéressant d'analyser le comportement du complexe MR sur un substrat ADN auquel seraient fixés des adduits type biotine ou d'autres protéines de la maintenance génomique.

Comme nous avons pu en parler précédemment, chez les eucaryotes, une résection étendue des extrémités dans la direction 5'→3' est possible grâce à l'intervention d'une nucléase supplémentaire telle que Exo1 ou Dna2/Sgs1 (Figure 18). Il en résulterait la production d'une extrémité simple brin 3' utilisable par la recombinase. Dans ce processus, PCNA est impliqué *via* une interaction directe avec Exo1 dont il améliore la processivité (Chen et al, 2013).

L'action du complexe PCNA/MR de *P. furiosus*, en privilégiant le clivage interne du brin 5' près des extrémités, resterait donc cohérent avec la suite du processus de résection, il pourrait même en favoriser l'action en cas de blocage covalent des extrémités d'ADN. Ainsi le couple formé par la nucléase NurA et l'hélicase HerA chez les archées hyperthermophiles pourrait étendre la résection de façon similaire au rôle joué par Exo1 (Figure 19). Nous n'avons toutefois pas testé ces partenaires et nous ne savons pas comment ces protéines sont recrutées au niveau de la zone de dommage. Une association physique entre MR et HerA a été reportée chez *Sulfolobus acidocaldarius* (Quaiser et al, 2008) mais pas entre les protéines de *P. furiosus* (Hopkins & Paull, 2008), le mécanisme de cette interaction reste donc à éclaircir où le PCNA pourrait y avoir un rôle.

Mais l'absence du couple HerA/NurA chez d'autres archées soulèvent de nouvelles questions. Récemment parmi les Thermococcales, une exonucléase (3'→5') a été identifiée, nommée Exo1, elle ne semble toutefois pas être un homologue fonctionnel de son homonyme eucaryote (Tori et al, 2013). Ceci indique qu'il nous reste probablement des acteurs de la recombinaison à découvrir.

✦ **Quels seraient les autres partenaires potentiels ?**

Chez les eucaryotes, deux équipes ont révélé que les protéines de fixation à l'ADN simple brin RPA et SSB interagissaient avec des membres du complexe, Nbs1 et Mre11 (Oakley et al, 2009; Richard et al, 2011). Ainsi, orienter la caractérisation du complexe MR vers l'étude de l'influence du RPA sur sa fonction constituerait une recherche constructive. Il pourrait en être de même avec la recombinaise RadA chez les archées dont les orthologues sont Rad51 (eucaryotes) et RecA (bactéries). Lors de la réparation des cassures double brin, les recombinaises interviennent après l'étape de résection des extrémités simple brin gérée par le complexe MR. Elles forment un filament nucléoprotéique favorisant l'échange des brins par homologie. Chez les eucaryotes, Rad51 et Mre11 sont toutes deux essentielles à la réinstallation du réplisome au niveau de la fourche de réplication après un arrêt provoqué par un stress cellulaire (Hashimoto et al, 2011). Le complexe MRN arrivant le premier sur les lieux de l'accident, il est tentant de spéculer qu'il pourrait favoriser le recrutement de Rad51 et déclencher la recombinaison homologue. À *contrario* chez les archées, MR pourrait restreindre l'activité de RadA pour réduire les phénomènes de recombinaison chez les organismes polypléides comme l'archée *Haloferax volcanii*, et favoriser ainsi une seconde voie de réparation (Delmas et al, 2013). Dans ce contexte, une interaction spécifique du complexe MR avec RadA serait intéressante à explorer *in vitro* en analysant activités nucléases et activité recombinaise sur des substrats ADN adaptés.

Élargir le réseau des acteurs de la recombinaison pourrait encore nous révéler de nouvelles interactions avec des protéines également impliquées à la fourche de réplication comme PCNA.

✦ **Cette interaction PCNA/MR est-elle essentielle *in vivo* ?**

Des analyses génétiques réalisées chez des archées hyperthermophiles *T. kodakarensis* et *S. islandicus* ont montré que les protéines Mre11 et Rad50 ne pouvaient être délétées de la souche sans engendrer sa mort (Tableau 4). Mais qu'en est-il si la séquence délétée ne concerne que le motif Mre11 PIP-like ? Au sein du laboratoire, un système de délétion des gènes a été développé chez *Thermococcus barophilus* (Thiel et al, 2014). Cette archée hyperthermophile du même ordre que *P. furiosus* dispose d'un motif d'interaction au PCNA similaire dans la région C-terminale de Mre11. Les expérimentations sont actuellement en cours pour déléter uniquement cette courte séquence de Mre11 ce qui permettrait de savoir si ce motif est important ou même essentiel à la croissance de cette archée. Toutefois, ne connaissant pas toutes les fonctions de l'extrémité C-terminale de Mre11, il sera difficile de répondre de manière sûre à la question initiale, cela constituera malgré tout une information à avoir.

✦ **Les protéines MR et PCNA sont-elles co-localisées ?**

En complément, il serait possible de suivre la localisation *in vivo* des protéines du complexe grâce à une approche d'imagerie cellulaire, ceci permettrait de savoir si elles sont co-localisées à la fourche de réplication et/ou au niveau de cassure double brin. Une technique a déjà été développée sur l'archée

*Haloferax volcanii* au laboratoire d'Optique et Biosciences à Paris (Lestini et al, 2015). Pour le moment, aucun motif d'interaction au PCNA n'a été identifié dans la séquence Mre11 de cette archée bien que certaines de ces voisines Halobactériales présentent le PIP-motif canonique. Il est possible que des études ultérieures démontrent une conservation de cette interaction à travers les différentes branches des archées, auquel cas il serait intéressant d'envisager cet outil d'exploration *in vivo*.

#### ✦ **Compétition ou coopérativité pour se lier au PCNA à la fourche de réplication ?**

Le motif identifié dans la région C-terminale de Mre11 est aussi présent dans la protéine Hel308 mais de nouveau, uniquement chez les Thermococcales. Hel308<sup>Hjm</sup> est une hélicase supposément impliquée dans la recombinaison grâce à son activité pour la migration des jonctions de Holliday (Guy & Bolt, 2005). Mais son interaction au PCNA chez *P. furiosus*, sa préférence pour fixer les substrats ADN de type fourche (Fujikane et al, 2006) ainsi que son essentialité *in vivo* (Dorazi et al, 2007) en ont fait un excellent candidat pour agir en cas de rupture de la fourche de réplication. La présence d'un motif très semblable d'interaction au PCNA pour Mre11 et Hel308<sup>Hjm</sup> soulève la question d'une coopérativité probable de ces deux enzymes dans un même mécanisme orchestré par PCNA.

Sur des substrats ADN appropriés, il serait intéressant d'établir un inventaire des structures ADN sur lesquelles ces enzymes peuvent intervenir indépendamment et avec PCNA. En parallèle, une approche par cryo-microscopie permettrait de visualiser l'agencement de cet assemblage macromoléculaire et ainsi déterminer si le complexe MR et Hel308<sup>Hjm</sup> peuvent s'amarrer simultanément au trimère de PCNA.

Actuellement des expérimentations sont en cours pour, d'une part valider le modèle de résection proposé dans l'article et d'autre part apporter une caractérisation structurale au complexe PCNA/MR. Suite à cela divers axes de recherche sont possibles suivant la question à laquelle on souhaite répondre. Mais il faudra probablement combiner plusieurs approches pour révéler la fonction de cette interaction chez les archées.



## CHAPITRE II : MCM/XPD

---

### *Quand des hélicases s'en mêlent*

#### **Plan de l'étude :**

##### I. Présentation des protéines

1. MCM
2. XPD
3. Intérêt d'une interaction entre hélicase

##### II. Matériels et méthodes

1. Protéines
2. Oligonucléotides et substrats ADN
3. Activité hélicase et fluorescence

##### III. Résultats

1. Du clonage à la production de *PabXPD*
2. Caractérisation de *PabMCM*.

##### V. Discussion et perspectives

*Nous arrivons à présent au second et dernier chapitre, celui-ci est consacré à l'étude de l'interaction entre deux hélicases de l'ADN : MCM et XPD. Comme précédemment une première partie décrit ces deux protéines, avant de s'intéresser aux résultats obtenus.*

## I. PRÉSENTATION DES PROTÉINES

Les hélicases sont des acteurs incontournables des procédés cellulaires liés aux acides nucléiques. Étant capables de dérouler l'ADN double brin, les hélicases permettent aux différents acteurs de la maintenance génomique d'y intervenir. Dans la revue (van Brabant et al, 2000), le rôle majeur de ces protéines est résumé ainsi : « The fundamental activity of helicases is to provide accessibility. »

Concrètement, c'est en brisant les liaisons hydrogènes entre les bases nucléiques que les hélicases provoquent la rupture d'intimité entre les deux brins d'ADN. Elles poursuivent leur travail en se déplaçant le long des brins grâce à l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP. Assimilé à un glissement sur le brin, le déplacement des hélicases peut se faire selon les polarités 3' → 5' et/ou 5' → 3'. Les hélicases dites bipolaires glissent sur l'ADN dans les deux sens.

Une protéine est catégorisée comme étant une hélicase dès lors qu'elle présente dans sa séquence d'acides aminés la signature identitaire des hélicases. Deux motifs sont communs à toutes les familles hélicases, les motifs Walker A et Walker B (Walker et al, 1982). Ils sont essentiels pour fixer l'ATP et recruter le cation divalent ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  généralement) ; ce dernier intervenant durant l'hydrolyse de la liaison. Selon ce principe, les hélicases ont été répertoriées en six superfamilles (SF 1-6) (Gorbalenya & Koonin, 1990; Singleton et al, 2007) qui ont chacune leurs propres caractéristiques. Les particularités fonctionnelles de chaque hélicase se manifestent suivant le type de substrat auquel elles sont liées ou encore suivant les interactions potentielles qu'elles ont avec d'autres protéines.

Chez *Pyrococcus abyssi*, l'étude du réseau d'interaction des protéines de la maintenance génomique a révélé une interaction potentielle entre MCM et XPD, deux hélicases bien différentes.

### 1. MCM

MCM (*MiniChromosome Maintenance*) appartient à la superfamille des AAA<sup>+</sup> (SF6), famille dont les membres sont associés à diverses activités cellulaires regroupant aussi bien des hélicases, des protéases que des protéines chaperonnes. Le complexe MCM a été le premier complexe hélicase réplcatif à être identifié. Se positionnant à l'origine de réplication, il permet l'ouverture de la double hélice d'ADN pour laisser entrer les autres complexes protéiques impliqués dans ce processus.

#### a) DES PROCARYOTES AUX EUCARYOTES

Généralement matérialisé sous la forme d'un anneau, le complexe MCM est constitué de six unités (hexamère) différentes chez les eucaryotes (6 versions du gène, mcm2 à 7) mais identiques chez la plupart des archées (à l'exception des *Methanococcales*, Walters & Chong, 2010). Parmi les bactéries,

aucune protéine n'est homologue à MCM, toutefois l'ouverture de l'hélice d'ADN à l'origine de réplication est prise en charge par l'hélicase 5'→3' DnaB (homohexamère appartenant à la SF4). Certains génomes de bactériophages présentent des hélicases orthologues à MCM, comme l'archaeophage HSTV-1 ou le virus d'archées BJ1 (Bochman & Schwacha, 2009).

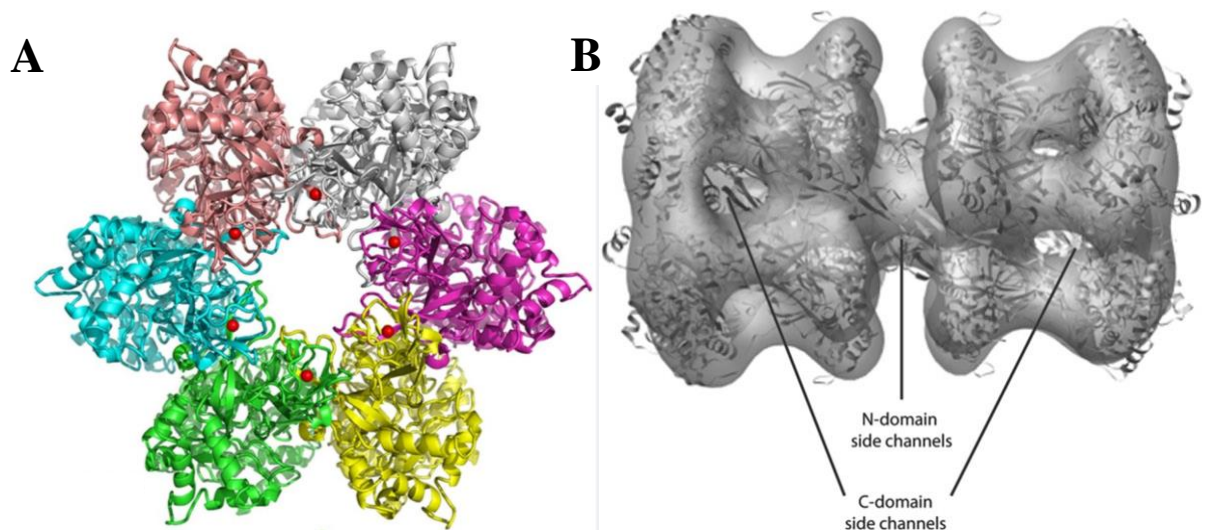
### ***b) CONFIGURATIONS ET ACTIVITÉS, LES DIFFÉRENTES FACETTES DE MCM***

Le complexe MCM est schématisé tel un collier à six perles, car c'est la forme la plus souvent répertoriée en solution pour cette protéine aussi bien chez les eucaryotes que chez les archées. Néanmoins, des études dévoilent le complexe MCM agencé sous la forme d'un double hexamère, et certaines observations par microscopie électronique révèlent des assemblages plus complexes de MCM en heptamères ou encore formant des filaments (Costa et al, 2006; Slaymaker et al, 2013). La configuration adoptée par cette hélicase ne semble donc pas encore clairement comprise.

C'est parmi les archées, bien qu'étudiées plus tardivement, qu'il y a le plus de données structurales disponibles : *Sulfolobus solfataricus* (Figure 32) et *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Ces informations sont importantes pour appréhender le mécanisme opéré par le complexe MCM lors de la séparation des deux brins d'ADN et de son déplacement.

Présentant une activité ATPase dépendante de l'ADN, l'hélicase hexamérique possède plusieurs sites d'incorporation de l'ATP. Les mécanismes précis de fixation et d'hydrolyse de cet ATP font encore débat. La translocation de l'anneau MCM, couplée à l'hydrolyse de l'ATP, s'effectuerait dans le sens 3'→5' tout en ouvrant la double hélice d'ADN selon un mécanisme qui reste là aussi, encore à confirmer. Plusieurs modèles de mécanismes sont proposés à l'heure actuelle (Slaymaker & Chen, 2012). Par exemple, selon le modèle d'exclusion stérique, un simple brin d'ADN passerait par le canal central formé par les six unités MCM, puis la translocation du complexe exercerait une tension sur ce brin. La séparation de l'hélice résulterait ainsi de l'exclusion stérique du second brin d'ADN. Ce modèle implique la présence initiale d'ADN simple brin à partir duquel MCM peut lancer son activité hélicase.

D'un autre côté, l'étude réalisée par Kaplan avec les Mcm4-6-7 eucaryotes paraît indiquer que le procédé employé par MCM est de type *pump in ring* comme l'hélicase bactérienne DnaB (Kaplan et al, 2003). Dans ce modèle, l'hélicase encercle l'ADN simple brin et se déplace dans une direction mais si le second brin ne possède pas de groupe encombrant, il peut lui aussi passer à travers le canal central de MCM sans qu'il y ait déroulement. Le complexe MCM pourrait donc se déplacer sur le double brin, ce qui expliquerait sa présence le long de la chromatide (Kuipers et al, 2011) et cette compétence pourrait être employée pour d'autres fonctions.



**Figure 32. Structure du MCM de *Sulfolobus solfataricus*.**

(A) Structure cristallographique de la forme hexamère avec les atomes de zinc indiqués en rouge (code PDB : 3F9V ; Brewster et al, 2008). (B) Complexe MCM sous sa configuration de double hexamère visualisé par microscopie électronique (Slaymaker & Chen, 2012).

### c) CHARGEMENT À L'ORIGINE DE RÉPLICATION

Comme nous avons pu en parler dans la partie « Introduction bibliographique », la reconnaissance de l'origine de réplication *oriC* chez les archées se fait par les facteurs Cdc6 et Orc1. Interagissant avec MCM (Kasiviswanathan et al, 2005) et pouvant dénaturer la région *oriC* (Matsunaga et al, 2009), ces deux protéines permettraient le chargement de l'hélicase pour démarrer la réplication. En s'appuyant sur l'analyse structurale du MCM de *S. solfataricus*, les chercheurs proposent que le chargement des hexamères se fasse dans des directions opposées entre les deux protéines de reconnaissance (Slaymaker & Chen, 2012).

### d) DES PARTENAIRES BIEN PLACÉS

Dans l'initiation de la réplication, d'autres facteurs protéiques sont impliqués, parmi eux le complexe GINS, dont la fonction demeure un mystère. Composé de deux sous-unités chez les euryarchées **Gins51** et **Gins23**, ce complexe forme un tétramère identifié au niveau de la région *oriC* chez *P. furiosus* (Yoshimochi et al, 2008). Cette même équipe de chercheurs, a mis en évidence l'interaction du complexe GINS avec le couple Cdc6/Orc1 et surtout avec MCM. En effet, les expériences réalisées *in vitro* montrent que le complexe GINS stimule l'activité hélicase et ATPase de MCM. Cette interaction fonctionnelle entre GINS et MCM a été confirmée très récemment chez *Sulfolobus solfataricus* où le complexe GINS améliore la processivité de l'hélicase en favorisant sa fixation à l'ADN (Lang & Huang, 2015).

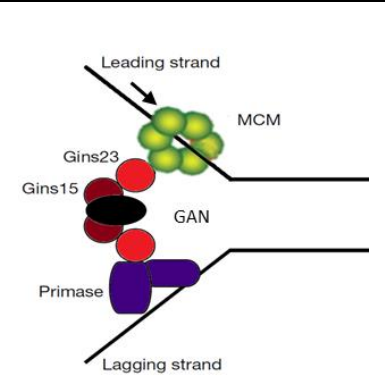
Associée au GINS, Cdc45 est une exonucléase qui chez les eucaryotes est impliquée dans la formation du complexe CMG et est nécessaire à l'activation de MCM (Makarova et al, 2012). Des homologues



fonctionnels ont été identifiés chez les bactéries (RecJ) et plus récemment parmi les archées (**GAN**, Li et al, 2011a).

Chez *S. solfataricus*, MCM ainsi que le complexe GINS interagiraient avec la **primase** (Marinsek et al, 2006). Étonnamment, certaines archées possèdent à la fois une primase de type eucaryote (PriSL) et la primase bactérienne DnaG-like. PriSL de *S. solfataricus* interagiraient avec le complexe GINS. Par cette liaison, ce complexe pourrait établir un pont afin de coordonner les activités entre l'hélicase MCM et la primase (schéma du Tableau 8). Plus récemment, Bauer *et al.* ont constaté une coopération entre la primase *SsoDnaG* et *SsoMCM* (Bauer et al, 2013). Cette interaction *via* l'ADN a une influence uniquement sur l'activité ATPase de MCM qu'elle stimulerait. L'implication de DnaG reste cependant l'objet de débat puisque plusieurs études semblent plutôt indiquer que cette protéine est associée à l'exosome chez les archées (Guilliam et al, 2015). Ces résultats apportent des éléments supplémentaires pour la compréhension de l'initiation de la réplication mais la dynamique du processus reste obscure.

**Tableau 8. Partenaires potentiels de MCM chez les Archaea. Schéma d'après Marinsek et al, 2006.**

Protéines	Action sur MCM	Organisme	Référence
	<b>Gins</b>	Stimule l'activité hélicase et ATPase Chargement à l'ADN	<i>P. furiosus</i> <i>T. acidophilum</i> <i>S. solfataricus</i> Lang & Huang, 2015; Ogino et al, 2014; Yoshimochi et al, 2008
	<b>GAN</b> RecJ/Cdc45	Composant structural du complexe CMG	<i>Archaea</i> Makarova et al, 2012
	<b>DnaG</b>	Stimule l'activité ATPase	<i>S. solfataricus</i> Bauer et al, 2013

### e) UNE HÉLICASE DIFFICILE À SUIVRE.

Un problème demeure pour comprendre le fonctionnement de cette hélicase. Chez les eucaryotes, les six protéines MCM sont essentielles pour l'initiation et l'élongation de la réplication (Tercero et al, 2000). Cependant seules MCM 4, 6 et 7 présentent une activité hélicase détectable (Kaplan & O'Donnell, 2004). Parmi les versions MCM simplifiées des archées, seuls les travaux réalisés avec le MCM de *S. solfataricus* et de *P. furiosus* ont permis de visualiser expérimentalement cette activité de déroulement de l'ADN (Liew & Bell, 2011; Yoshimochi et al, 2008).

Il est étonnant de constater qu'une protéine aussi importante pour la réplication puisse aussi difficilement être exploitable *in vitro*. Cependant, il est probable que d'autres partenaires protéiques soient encore à identifier pour permettre de faire fonctionner efficacement cette hélicase bien discrète sur l'étendue de ces capacités.

## 2. XPD

Bien que de conformation relativement plus simple que MCM, XPD donne du fil à retordre. Hélicase de polarité 5'→3' et présentant une activité ATPase dépendante de l'ADN, XPD appartient à la plus large famille d'hélicases : SF2 (Singleton et al, 2007). De conformation monomérique en solution, elle a été initialement isolée chez les eucaryotes (ERCC2 pour XPD humain, Rad3 pour son homologue chez la levure) avant d'être identifiée par homologie parmi les archées.

Pour les cellules humaines, cette hélicase est primordiale. Des mutations chez XPD provoquant son dysfonctionnement sont à l'origine de maladies génétiques graves. Chez les eucaryotes, XPD est une hélicase très demandée. Intégrée au complexe TFIIH, elle est sollicitée pour l'initiation de la transcription ainsi que pour le mécanisme de réparation des dommages à l'ADN par exclusion de nucléotides (NER) (Compe & Egly, 2012).

### a) UNE STRUCTURE DE FER

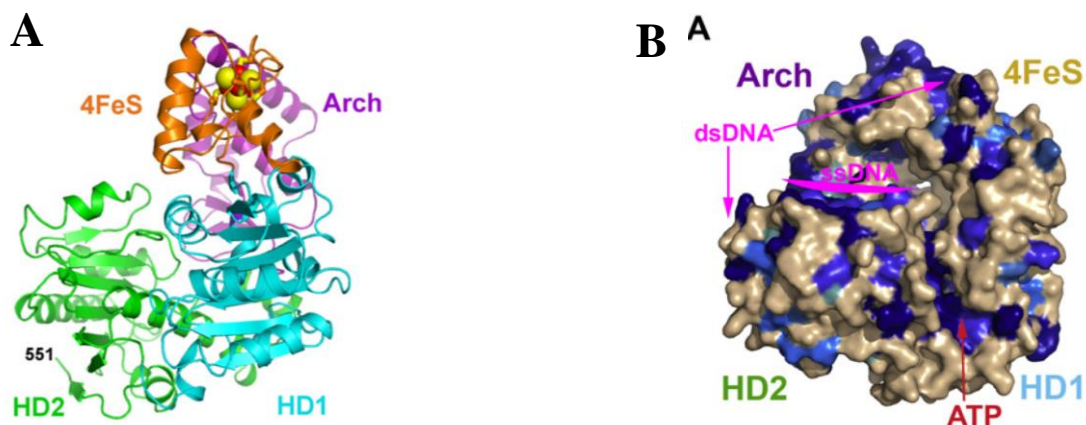
La structure de XPD a pu être étudiée chez trois archées : *Thermoplasma acidophilum*, *Sulfolobus acidocaldarius* et *Sulfolobus tokodaii*.

Illustrée dans la Figure 33.A, la structure de XPD présente les deux domaines hélicases nommés HD1 et HD2 puis deux autres domaines spécifiques à XPD : le domaine Arch et le cluster 4[FeS]. L'ADN simple brin passerait dans le sillon entre HD2 et Arch avant de s'engouffrer dans le tunnel formé par Arch, 4FeS et HD1 (Figure 33.B). Wolski *et al.*, supposent également que cette poche serait capable de reconnaître les lésions dans l'ADN (Wolski et al, 2008).

Chez *S. acidocaldarius*, 3,3 moles de fer ont été quantifiées par mole de protéine XPD (Rudolf et al, 2006). Ce fer serait retenu par quatre résidus cystéines formant ainsi le cluster 4[FeS]. Inséré entre les deux domaines hélicases, sa conformation pourrait changer lorsque de l'ATP est fixé ou hydrolysé,

suggérant que ce cluster aiderait à l'ouverture de l'ADN double brin (Lehmann, 2008). Cette observation se confirme lorsque des mutations, réalisées au niveau de ces cystéines, entraînent une perte de l'activité hélicase (Rudolf et al, 2006).

Ces clusters FeS sont généralement identifiés dans des protéines où ils participent au transport des électrons. Le pouvoir oxydo/réducteur du cluster favoriserait le transport des électrons, et dans le cas des hélicases, il serait un moyen de détecter les dommages sur l'ADN (Yavin et al, 2006) ou encore de contrôler l'activité des autres protéines de la réplication et réparation en cas de stress oxydatif (Boal et al, 2005).



**Figure 33. Structure et modélisation de XPD de *Sulfolobus acidocaldarius*.**

La structure est représentée en (A) avec les feuillettes  $\beta$ , hélices  $\alpha$  et boucles puis en (B) en modélisation de surface. Les principaux domaines de la protéine sont indiqués : HD1 (cyan) domaine hélicase ; HD2 (vert) surface de fixation de l'ATP ; 4FeS (orange) cluster composé de quatre cystéines retenant le fer ; Arch (violet) domaine Arch. (Code PDB 3CRV;(Fan et al, 2008).

### ***b) MUTATIONS ET SYNDROMES, XPD AU CŒUR DES PROBLÈMES***

Les protéines XP ont été identifiées chez l'humain suite au diagnostic de phénotype cancéreux ayant pour origine un dysfonctionnement d'un de ces acteurs.

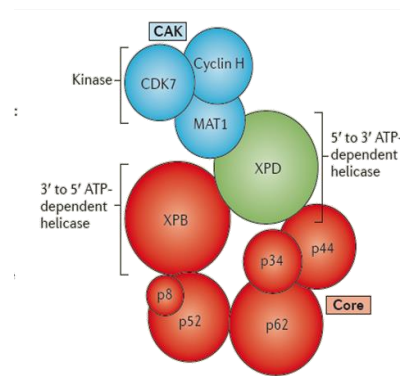
Des mutations touchant XPD peuvent être à l'origine de trois phénotypes distincts : Xeroderma Pigmentosum (XP), Syndrome de Cockayne (CS) et Trichothiodystrophie (TTD). Ces maladies sont toutes les trois caractérisées par une hypersensibilité des cellules à la lumière. Mais alors que les patients XP présentent une prédisposition aux cancers de la peau 100 fois plus élevée, les patients CS ou TTD sont plus touchés par un vieillissement prématuré, accompagné de troubles du comportement. La question souvent posée fut : comment des mutations distinctes au sein d'une seule et même protéine peuvent provoquer des maladies aussi diverses ? Ces variations s'expliquent par l'implication à différents niveaux de XPD dans les processus de maintenance génomique. Les mutations générées dans l'hélicase XPD peuvent altérer, suivant le domaine touché, son affinité à l'ADN, sa capacité de

fixation et d'hydrolyse de l'ATP ou encore des surfaces auxquelles d'autres protéines se lient durant un processus (Fan et al, 2008) n'ayant ainsi pas le même effet sur la cellule.

### c) XPD, ENRÔLÉ AU SEIN DU COMPLEXE TFIIH

TFIIH (Transcription factor II H) est un large complexe constitué de 10 sous-unités inventoriées par Compe *et al.* (Compe & Egly, 2012) et agencées comme présenté dans la Figure 34. Chez les eucaryotes, l'hélicase XPD permettrait de rapprocher le cœur du complexe TFIIH et le complexe de kinases CAK en établissant un pont entre les protéines p44 et MAT1 (Reardon et al, 1996) et en coordonnant ainsi leur activités.

L'initiation de la transcription requiert au moins six facteurs (THIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF) dont TFIIH, pour activer et réguler la transcription des ARN messagers par l'ARN Polymérase II. Ainsi XPD participe à une cascade de régulation visant à contrôler le cycle cellulaire et la transcription (Dubaele et al, 2003). Mais au cœur de ce complexe, XPD n'y a qu'un rôle structural pour ce processus (Winkler et al, 2000) ce qui n'est plus le cas lorsque TFIIH intervient pour réparer l'ADN.



**Figure 34. Structure du complexe TFIIH**

Composé de dix sous-unités chez les mammifères, TFIIH possède deux subcomplexes : l'un appelé le *core* sur le schéma (rouge) et l'autre le complexe CAK (cyclin-dépendent kinase (CDK)-activating kinase) en bleu. L'hélicase XPD fait la liaison entre ces deux subcomplexes en interagissant avec MAT2 et p44 (Compe & Egly, 2012).

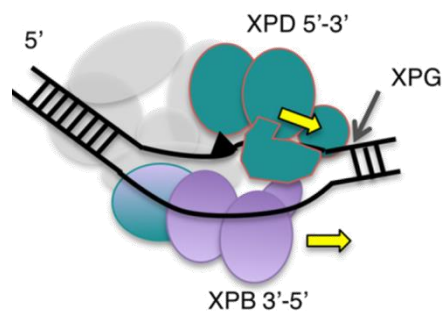
### d) IMPLICATION DANS LE MÉCANISME NER

Le mécanisme NER est le procédé qui gère la plupart des dommages de l'ADN causés par des agents extérieurs tel que les ultraviolets. L'apparition de dimère de thymine ou encore d'adduit sur les bases de l'ADN génère une distorsion de la double hélice problématique pour les mécanismes de réplication et de transcription.

Recruté par XPC chez les eucaryotes, le principal rôle du complexe TFIIH dans le NER est d'ouvrir l'hélice d'ADN à la zone du dommage pour permettre aux autres acteurs d'intervenir, d'exciser l'oligonucléotide endommagé puis de le remplacer par un nouveau fragment d'ADN (Compe & Egly,

2012). Hélicase 5'→3', XPD serait chargée d'ouvrir l'ADN ayant subi la lésion dans un sens tandis que son collègue XPB, hélicase 3'→5' s'occuperait d'étendre l'ouverture dans le sens opposé (Figure 35). Le rapatriement de TFIIH se ferait *via* XPB qui, par son activité ATPase, stabiliserait le complexe TFIIH sur l'ADN endommagé (Oksenysh et al, 2009). Contrairement au processus de transcription, ici les fonctions enzymatiques de XPD (hydrolyse et déroulement de l'ADN) sont requises pour la voie du NER chez les eucaryotes (Kuper et al, 2014).

Chez les bactéries, la réparation par excision de nucléotide est prise en charge par le complexe UvrABC qui reconnaît et clive la région du dommage.



**Figure 35. Ouverture de la double hélice d'ADN par XPD et XPB dans la zone du dommage (Rouillon & White, 2010).**

En parallèle, le complexe NER semble être impliqué dans la réparation post-réplivative de l'ADN, comme le suggère la présence de plusieurs acteurs du NER à proximité du réplisome tels que XPA qui possède en plus un motif d'interaction avec le PCNA, XPC et les hélicases XPD et XPF (Gilljam et al, 2012).

Néanmoins des zones d'ombres sont encore à éclaircir pour ce mécanisme notamment parmi les archées où les facteurs de la reconnaissance de la lésion (XPA, XPC) n'ont pas été identifiés chez ces procaryotes. Par ailleurs, l'analyse du phénotype des mutants délétés des gènes *xpd* ou *xpb* chez l'archée *Thermococcus kodakarensis* suggère que les deux hélicases correspondantes ne jouent pas un rôle majeur dans la voie du NER chez les Archaea, si tant est que cette voie existe vraiment. Cependant, de par ses caractéristiques structurales dont le cluster FeS, XPD pourrait bien participer à la reconnaissance du dommage (Yavin et al, 2006) bien que cette hélicase ne semblerait pas responsable de l'accumulation du complexe TFIIH dans les zones de dommages contrairement à son collègue XPB (Oksenysh et al, 2009). Mais étonnamment chez *S. acidocaldarius*, XPD ne semble pas être associé à un complexe multimérique (Rudolf et al, 2006) laissant présager que cette hélicase pourrait bien être investie d'une mission en dehors du complexe TFIIH. En 2013, une étude alliant la technique de microscopie à force atomique avec l'analyse de molécule unique a révélé que l'hélicase eucaryote XPD pouvait scanner l'ADN et identifier diverses structures apparentées à des lésions appuyant pour un rôle dans la reconnaissance des dommages de l'ADN (Buechner et al, 2013).

Pour les bactéries, le processus emploie trois protéines (UvrA, UvrB et UvrC) tandis que les eucaryotes font appel à une quinzaine de protéines pour constituer le cœur du processeur NER. Chez les archées, il est possible qu'un mécanisme dérivé du NER, plus simple, existe et dont nous devons encore en trouver les rouages. Certaines archées possèdent même une combinaison du système UvrABC bactérien avec une partie des protéines du système NER eucaryote (White, 2003).

### 3. INTÉRÊT D'UNE INTERACTION ENTRE HÉLICASES

#### a) RÉPLICATION VERSUS TRANSCRIPTION

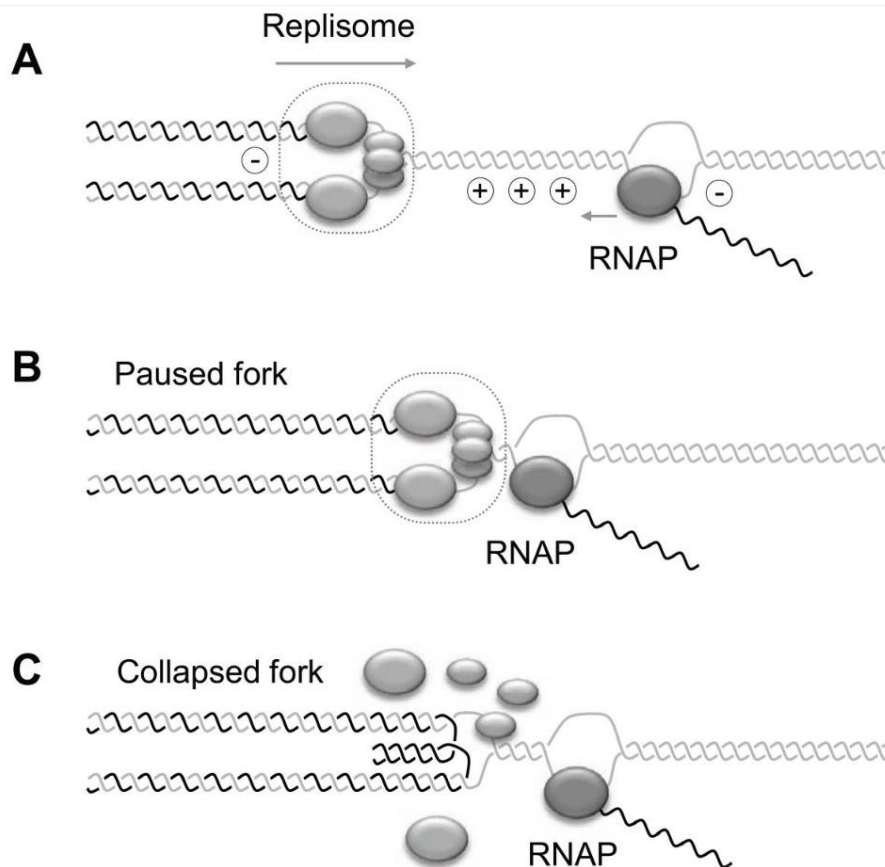
« Traffic congestion is an unfortunate part of everyday life » (Finkelstein & Greene, 2009). Lors de la multiplication des cellules, plusieurs processus sont enclenchés : réplication, transcription, traduction, réparation et recombinaison. La simultanéité de ces événements peut créer des conflits sur l'ADN entre les protéines des différents mécanismes ; ils doivent alors être résolus pour assurer la stabilité génomique. Un des accidents les plus problématiques est celui généré par la collision des machineries de réplication et de transcription (Honda et al, 2009; Soultanas, 2011).

Deux cas peuvent être rencontrés (Figure 36) :

1. le réplisome et le complexe de transcription évoluent dans la même direction : il est intéressant de constater que dans les génomes bactériens, les gènes proches de l'origine et donc fortement exprimés, sont généralement alignés dans la même direction. Toutefois, l'ADN polymérase évoluant 10 à 20 fois plus vite que l'ARN polymérase (chez les bactéries), les collisions semblent inévitables.
2. les deux machineries se déplacent sur l'ADN dans des directions opposées, et seront donc amenées à se faire face.

Ces collisions sont délétères pour l'ADN. L'un des points chauds pour ces mauvaises rencontres est la région des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr). Hautement sollicités pour la production des protéines lors de la phase exponentielle de croissance, les ribosomes doivent être produits en quantité suffisante pour répondre à la demande. Plusieurs ARN polymérases, codant pour l'ARN messager, peuvent travailler en même temps dans la région alors que la réplication du génome se poursuit inéluctablement.

La machinerie de transcription est plus stable (supérieur à plusieurs heures) que le réplisome dont le temps de demi-vie est de 4 à 6 min chez *E. coli* (McGlynn & Guy, 2008; Uptain & Chamberlin, 1997). Par conséquent, la rencontre de ces deux complexes provoque la déstabilisation du réplisome. L'ADN ayant été très sollicité peut se rompre et générer une cassure double brin.



**Figure 36. Schématisation d'une collision entre les complexes de réplication et transcription chez les eucaryotes (Lin & Pasero, 2012).**

(A) Les complexes progressent dans des sens opposés. La convergence des polymérase génère une accumulation de supertours positifs (+) à l'ADN. (B) La rencontre des deux machineries provoque un arrêt de la réplication. (C) Cette fragile structure peut aboutir à un désassemblage du complexe de réplication et induire des phénomènes de recombinaison homologue au niveau du réplisome.

### ***b) PROTECTION DE LA TRANSCRIPTION***

Chez les eucaryotes il existe des « ribosomal fork barriers (RFBs) » pour protéger les sites les plus sensibles, notamment la région avec l'ARNr comme expliqué précédemment. Cette barrière, composée de protéines ou formée par une structure inhabituelle de l'ADN, est établie à la périphérie du locus ARNr. Elle empêche la fourche de réplication de pénétrer sur le site lorsque leur transcription est active. Cependant, plusieurs études ont montré que l'arrêt à ces RFBs induisait également des cassures et favorisait le processus de recombinaison homologue (Lin & Pasero, 2012).

### c) PROTECTION DU RÉPLISOME

Chez les bactéries et la levure, des hélicases ont été identifiées comme étant capables de permettre le passage du réplisome.

Chez *E. coli*, Boubakri *et al.* ont révélé par une étude *in vivo* que trois hélicases intervenaient à la fourche de réplication stoppée par une collision avec le complexe de transcription. Selon un mécanisme concerté, elles sont capables de déloger l'ARN polymérase du brin d'ADN et ainsi permettre le re-démarrage de la fourche de réplication (Boubakri *et al.*, 2010). Ces hélicases agiraient après collision pour libérer l'ADN double brin des éléments transcriptionnels et permettre au réplisome de se charger de nouveau à la fourche. DinG, hélicase de polarité 5'→3', progresserait sur le brin retardé, tandis que UvrD et Rep, de polarité inverse se déplaceraient sur le brin principal.

Appartenant à la SF2 des hélicases, DinG est l'homologue à Rad3 chez *S. cerevisiae* et XPD (ERCC2) chez l'humain. Cependant chez la levure c'est Rmr3 et non Rad3, qui est présupposée pour déplacer les protéines fixées sur l'ADN en amont de la fourche. De plus, Rmr3 se déplacerait en accompagnant la fourche pour intervenir avant que celle-ci ne soit stoppée (Azvolinsky *et al.*, 2006).

### d) INTERACTION MCM-XPD CHEZ *P. ABYSSI*

Concernant les archées, peu de chose sont connues sur les mécanismes pouvant pallier à ces rencontres entre les machineries de réplication et de transcription. On peut chercher un système similaire à celui des bactéries mais avec des protéines de type eucaryote. En regardant au niveau des hélicases, notre intérêt se tourne vers XPD, de par sa similitude avec l'hélicase bactérienne DinG mais aussi suite à son interaction potentielle avec l'hélicase répllicative, MCM (Pluchon *et al.*, 2013). Si ces deux arguments nous mènent à explorer cette voie, c'est également parce que les caractéristiques biochimiques de ces deux hélicases, viennent renforcer cette suggestion.

Le MCM de l'archée *M. thermotrophicus* est capable *in vitro*, de dérouler de l'ADN fixé par les histones ou encore par le complexe de pré-initiation à la transcription. Par contre, son activité est bloquée dès lors que cette protéine rencontre l'ARN polymérase avec l'ensemble du complexe transcriptomique (Shin *et al.*, 2007).

En parallèle de ces résultats, Honda *et al.*, ont pu suivre, en temps réel, le déplacement de l'hélicase XPD sur un brin d'ADN fixé par les protéines de liaisons à l'ADN simple brin, RPA1 et RPA2 de l'archée *Ferroplasma acidarmanus* (Honda *et al.*, 2009). Leurs résultats montrent que XPD peut progresser sur le brin d'ADN en délogeant la protéine ou alors en l'évitant. Les polarités de ces deux hélicases étant complémentaires, elles pourraient se déplacer chacune sur un brin de la fourche de réplication. Ces observations amènent une question : est-ce que l'activité couplée de ces deux hélicases a une chance de déstabiliser l'ARN polymérase ? Auquel cas, l'interaction MCM/XPD permettrait au réplisome de se maintenir à la fourche de réplication et de faire face à la machinerie de transcription.



## OBJECTIF DE L'ÉTUDE

L'hélicase répliquative MCM est un élément incontournable du processus de réplication pour ouvrir la double hélice d'ADN et permettre la mise en place du réplisome. Ces dernières années ont vu des avancées sur la compréhension du mécanisme de chargement de cette hélicase au niveau de l'origine de réplication. Cependant le mécanisme d'activation de cette enzyme reste à ce jour encore mal défini. Au laboratoire, MCM de *P. abyssi* n'a pas encore démontré d'activité hélicase *in vitro* malgré les différents essais réalisés et ce avec d'autres partenaires potentiels comme le complexe GINS. L'utilisation des mêmes conditions expérimentales opérées pour les caractérisations des MCMs de *P. furiosus* (Yoshimochi et al, 2008) ou encore de *S. solfataricus* (Liew & Bell, 2011) n'ont pas permis d'améliorer la détection de l'activité. Ces résultats infructueux font écho plus généralement aux difficultés rencontrées, par notre laboratoire et d'autres groupes travaillant sur ce sujet, pour exploiter cette hélicase *in vitro*. C'est ainsi que l'arrivée d'un nouveau partenaire potentiel de MCM, XPD a relancé les travaux sur cette hélicase.

L'objectif était d'étudier *in vitro* l'activité hélicase de ces deux enzymes séparément puis ensemble pour répondre à une première question : **XPD est-elle capable d'activer la fonction hélicase de MCM ?**

Ne disposant pas encore de la protéine XPD codée par *P. abyssi*, le clonage et la production de cette hélicase ont été entrepris par Aline Perquis, technicienne au laboratoire. Les difficultés rencontrées au cours des différentes étapes ont retardé la possibilité de caractériser l'interaction avec le partenaire potentiel MCM. Toutefois un projet de caractérisation de l'activité hélicase de *PabMCM* a été proposé en parallèle en tant que sujet de stage de Master 2. Ainsi j'ai eu l'opportunité d'encadrer Alexia Muguët sur la caractérisation de MCM et l'étude de ses partenaires potentiels *via* une approche biophysique de fluorescence. Avec Etienne Henry, ingénieur de recherche au laboratoire, les techniques d'anisotropie de fluorescence et de *quenching* ont été mises en place afin de suivre la fixation et l'activité de déroulement de l'ADN par une hélicase.

Le but était de détecter l'activité hélicase de *PabMCM* et d'étudier l'influence de ses partenaires potentiels sur cette activité dans un contexte de fourche de réplication. À travers cette étude, nous espérons également apporter des éléments pour comprendre le rôle de XPD, une hélicase enrôlée dans un complexe protéique de réparation chez les eucaryotes, mais dont l'implication chez les *Archaea* n'est pas élucidée.

## II. MATÉRIELS & MÉTHODES

### 1. PROTÉINES

#### ✦ Clonage et expression de *PabXPD*

Le gène *xpd* de *P. abyssi* a été fourni par Genscript dans un vecteur de stabilisation pUC57 selon la séquence commandée (Annexe 6). Le gène a été inséré dans les plasmides pET28a<sup>+</sup> et pET25b<sup>+</sup> (Novagen) *via* l'utilisation du couple d'enzymes de restriction BamHI/NdeI. La construction obtenue avec pET28a<sup>+</sup> permet de traduire la protéine avec une extension de six histidines en N-terminal (His-tag). Les cellules d'expression des souches *E. coli*, Rosetta DE3 pLysS et BL21 DE3 (codon+RIL), ont été transformées avec ces constructions « plasmide/*xpd* ».

Le clone BL21 DE3 (codon+RIL) contenant le plasmide pET28a<sup>+</sup>/*xpd* a subi une transformation supplémentaire avec l'incorporation du plasmide pGroESL codant pour les protéines chaperonnes groEL et groES. Ce nouveau clone appelé XPD/pET28a<sup>+</sup>/pGroESL a été cultivé à 25°C dans du milieu LB complété en Kanamycine. La production de la protéine a été induite durant la phase exponentielle de croissance, à une DO<sub>600</sub> (densité optique à 600 nm) par l'ajout de 1 mM IPTG suivi d'une incubation de 4 h à 25°C. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans un tampon de broyage (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM Imidazole) puis lysé par sonication. Le surnageant a ensuite été déposé dans une colonne de nickel Ni-NTA (Qiagen), puis après des lavages successifs, la protéine fixée par le His-tag a été éluée dans le tampon précédent contenant 50 mM d'Imidazole.

Les échantillons ont été analysés en gel dénaturant SDS-PAGE (BioRad) en comparant avec un témoin de culture où l'induction à l'IPTG n'a pas été effectuée. La révélation des gels a été réalisée avec du bleu de Coomassie ou par une approche d'immunodétection. Cette dernière approche (Western-blot) permet de vérifier que la protéine observée en bleu est bien celle attendue en utilisant un anticorps dirigé contre le His-tag. L'anticorps primaire a ensuite été révélé par le kit ECL plus (Pierce<sup>TM</sup>).

#### ✦ Production et purification de *PabMCM*

La production de *PabMCM* a été faite dans des cellules d'*Escherichia coli* transformées (pQE80L/Rosetta pLysS). Le plasmide pQE80L contient la séquence génétique de *PabMCM* précédée de 6 codons codant pour l'histidine (*PabMCM* tag N-ter (6 His)). Les cellules pQE80L/Rosetta pLysS ont été cultivées à 37 °C dans un milieu LB (Lysogeny Broth, Beckton, Dickinson and Co), et l'induction du promoteur a été déclenchée par l'ajout d'IPTG à 1 mM après que la culture ait atteint

une  $DO_{600nm}$  (densité optique à 600 nm) de 0,8. Après trois heures d'incubation à 37°C, les cultures ont été centrifugées et les culots cellulaires resuspendus dans une solution contenant 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM imidazole, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, EDTA-free, Roche). Une pression de 1900 bars a lysé des cellules (One Shot System ; Constant Systems Limited). L'échantillon a ensuite subi un choc thermique de 75 °C durant 10 minutes, avant d'être traité aux DNases (Sigma) 2 heures à 37 °C et subir de nouveau le choc thermique.

Une première purification par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (Hisprep FF 16/10, GE Healthcare) a permis d'éluer la protéine avec gradient linéaire d'imidazole (20 mM à 500 mM) dans un tampon de 150 mM NaCl, 1 mM DTT, et 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Les fractions collectées ont été dialysées sur la nuit à température ambiante avec le même tampon sans imidazole. Les échantillons ont ensuite été traités en chromatographie par exclusion de taille (gel filtration) sur une colonne Superdex™ 200 (GE Healthcare). La séparation des protéines a été réalisée avec le tampon d'entraînement : 150 mM NaCl, 1 mM DTT et 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Les protéines ainsi purifiées ont été stockées à -20 °C dans une solution à 150 mM NaCl et 10 mM Tris-HCl pH 7,5 avec 20% de glycérol. Le dosage des protéines a été réalisé par mesure de l'absorbance à 280 nm. Dans les essais enzymatiques la concentration exprimée correspond à la quantité d'hexamères de MCM employée.

#### ✦ Partenaires de PabMCM

Les informations concernant le clonage et l'expression des protéines de *P. abyssi* ayant été employées dans les essais avec MCM sont résumées dans le tableau ci-dessous avec la publication associée pour le détail des procédures de purification.

**Tableau 9. Partenaires potentiels de PabMCM.**

Protéine	Vecteur	Souche <i>E. Coli</i>	His-tag	Référence
<b><i>PabGins</i></b>				
<b>Gins-23</b>	pFO4	Rosetta pLysS	6xHis	Groisillier et al, 2010
<b>Gins-51</b>	pFO4	Rosetta pLysS	6xHis	
<b><i>PabRecJ</i></b>				
	pFO4	Rosetta	6xHis	Groisillier et al, 2010
<b><i>PabPrimase</i></b>				
<b>P41</b>	pQE-80L	HMS 174	6xHis	Le Breton et al, 2007
<b>p46</b>	pET26b <sup>+</sup>	HMS 174	/	


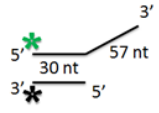
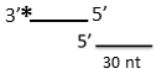
## 2. OLIGONUCLÉOTIDES ET SUBSTRATS ADN

Les substrats ADN double brin (ADNdb) sont préparés à partir d'oligonucléotides (simple brin) synthétisés *in-vitro* par la société Eurogentec. Afin de pouvoir visualiser l'ADN en fluorescence, un des oligonucléotides est marqué par un fluorochrome. Pour réaliser l'hybridation, un *aliquot* de chacun des brins est ajouté à un tampon d'hybridation (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl) de manière à ce que la concentration finale de chaque oligonucléotide soit égale à 1  $\mu$ M. L'échantillon est alors chauffé à 85 °C pendant 5 minutes afin de s'assurer de la linéarité des brins avant hybridation. Celle-ci se fait sur la nuit en laissant la température de l'échantillon redescendre jusqu'à 25 °C.

Le substrat ADNdb a été choisi de manière à mimer la conformation de l'ADN au niveau de la fourche de réplication (Tableau 10). Le premier substrat utilisé, nommé 88Ydb, a une forme de fourche : il est long de 88 nucléotides dont 44 consécutifs ne sont pas appariés. Ce substrat est marqué par le fluorophore FAM ( $\lambda_{\text{ex}} = 486 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{em}} = 524 \text{ nm}$ ) au niveau de son extrémité 3' hybridée, pour que le fluorophore ne soit pas sur le brin sur lequel se déplace l'hélicase. Le second substrat, nommé 87Ldb, a une forme de L : il est constitué d'une partie double brin de 30 nucléotides et d'une partie simple brin en 3' de 57 nucléotides. Le brin long est marqué en son extrémité 5' (hybridée) par le fluorophore FAM. Le brin court, quant à lui, possède en son extrémité 3', en face du fluorophore, un *quencher* (Deep Dark Quencher, Invitrogen) qui absorbe l'énergie émise par le fluorophore. Ce brin court a été substitué par un brin de séquence identique mais ne possédant pas de *quencher* pour les tests en anisotropie de fluorescence.

Pour les expériences de *quenching* de fluorescence, un petit oligonucléotide compétiteur appelé *trap*, a été utilisé pour réduire le taux de réhybridation de la séquence comportant le *quencher* à sa matrice au cours de la réaction.

**Tableau 10. Séquences ADN des substrats utilisés pour l'activité hélicase.**

Substrat ADNdb	Oligonucléotides
<p><b>Substrat 88Ydb</b></p> 	<p>5' TTGGCTCGTGCAGACGTGCGAGGTGAGGACGAGCTCCTCGTGACCACG 3' - <b>Fam</b></p> <p>5' CGTGGTCACGAGGAGCTCGTCCTCACCTCGACGTCTGCACGAGCTTT 3'</p>
<p><b>Substrat 87Ldb</b></p> 	<p><b>Fam</b>-5' CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA 3'</p> <p>5' ATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG 3' - <b>Quencher</b></p>
	<p>5' CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAAT 3'</p>

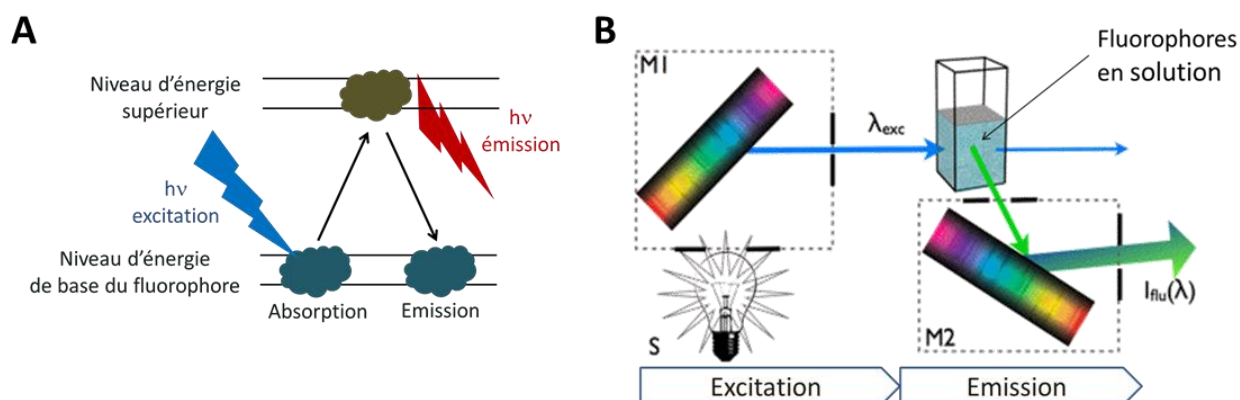
### 3. ACTIVITÉ HÉLICASE ET FLUORESCENCE

#### a) PRINCIPE DE L'APPROCHE PAR FLUORESCENCE

Les hélicases de l'ADN sont aussi appelés « nanobiomoteurs » car elles utilisent l'ATP comme carburant pour se déplacer sur l'ADN et catalyser le déroulement de la double hélice. Pour analyser cette activité, la technique standard est de déposer sur un gel non dénaturant l'échantillon après arrêt de la réaction et ainsi visualiser les intermédiaires d'ADN simple brin formés. Bien que ces techniques permettent d'appréhender la fonctionnalité de ces enzymes, seul le résultat final à un instant  $t$  est observé après avoir été « figé ». Seulement pour produire de l'ADN simple brin l'enzyme couple plusieurs mécanismes dont son déplacement sur l'ADN et l'hydrolyse de l'ATP. Pour tenter de comprendre cette mécanistique à plusieurs engrenages, des techniques de suivi en temps réel ont été développées, faisant appel à la fluorescence (Xi & Deprez, 2010). Les travaux menés précédemment au laboratoire quant à l'analyse de l'activité hélicase du MCM de *P. abyssi* n'ont pas abouti avec la technique standard des gels natifs. Nous avons donc choisi de suivre une approche par fluorescence, mais pour cela une adaptation technologique pour l'utilisation d'hélicases thermostables a dû être réalisée.

#### ✦ La fluorescence et les fluorophores

Le principe de base de la fluorescence repose sur l'excitation d'un fluorophore par un faisceau lumineux d'une longueur d'onde donnée. Cette molécule capable d'absorber l'énergie d'un photon va émettre en retour un photon d'énergie inférieure (Figure 37.A). La quantité de photons émis peut être mesurée par un photomultiplicateur (Figure 37.B). Ce phénomène peut être utilisé de manière directe pour de nombreuses applications, comme par exemple la quantification de molécules fluorescentes présentes dans un échantillon, ou encore la localisation de ces molécules dans un échantillon solide, mais aussi de manière indirecte par la mesure d'anisotropie ou de *quenching* de fluorescence.



**Figure 37. Principe et mesure de fluorescence émise par un fluorophore**

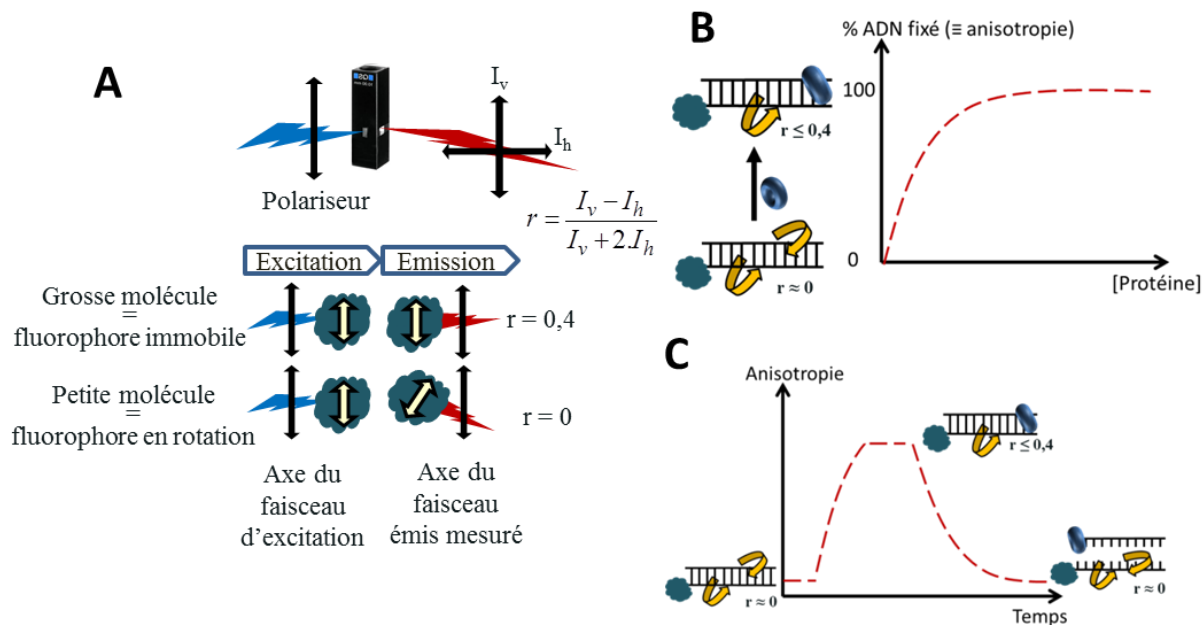
(A) Un fluorophore absorbe et émet à des longueurs d'onde distinctes l'énergie des photons. (B) Principe de mesure de la fluorescence à partir d'une solution dans une cuve spectrofluorimétrique. Adapté de Visser, 2010.

### *b) ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE*

L'anisotropie de fluorescence est la mesure de la dépolarisation de la lumière. Cette dépolarisation est due au mouvement par diffusion rotationnelle du fluorophore entre l'absorption et l'émission de photons. Elle peut être estimée en mesurant le déplacement angulaire moyen entre l'axe du faisceau de lumière d'excitation (lumière polarisée) et l'axe du faisceau principal de lumière émise. Si un fluorophore est immobile ou quasi-immobile, les moments d'absorption et d'émission sont dans la même direction, la dépolarisation est alors faible, ce qui se traduit par une valeur d'anisotropie grande (tous les photons sont émis dans le même axe). À l'inverse, plus la vitesse de rotation du fluorophore est grande par rapport à celle de transition d'énergie, plus la lumière sera émise dans toute les directions (absence d'orientation de l'émission des photons) et plus la valeur d'anisotropie sera petite (Figure 38.A).

Dans une solution à l'équilibre, l'anisotropie de fluorescence est sensible à la diffusion rotationnelle ; le poids moléculaire auquel est lié le fluorophore impacte fortement le temps de demi-vie de fluorescence. En liant covalamment un fluorophore au brin d'ADN susceptible d'être relargué par l'action de l'hélicase, il est possible de suivre en simultané la fixation à l'ADN ainsi que son déroulement, le tout dans un seul échantillon et en temps réel. Ceci rend possible la détermination des paramètres cinétiques de ces deux processus.

Deux applications reposant sur cette mesure ont été utilisées : les tests de fixation à l'ADN et ceux de séparation des deux brins d'ADN ou ouverture de l'ADN. Pour la fixation à l'ADN (Figure 38.B) la mesure se fait dans un premier temps seulement en présence d'ADN afin de déterminer l'anisotropie de base, puis la protéine testée est ajoutée et le changement d'anisotropie est mesuré. L'ADN libre est très mobile avec une anisotropie faible tandis que lorsque la protéine s'y fixe son volume/poids augmente et il perd de sa mobilité. Pour le test d'ouverture de l'ADN (Figure 38.C), en revanche, on s'intéresse au phénomène inverse : le point de départ est l'ADN fixé par la protéine, avec une anisotropie grande, et le point d'arrivée est l'ADN dissocié et libéré de la protéine, avec donc une anisotropie faible.



**Figure 38. Détection d'une activité hélicase par anisotropie de fluorescence.**

(A) Méthodologie de la mesure et phénomènes associés. Schéma adapté de Lakowicz, 2006 (B) Principe de la mesure d'affinité d'une protéine pour l'ADN. L'ADN libre est mobile tandis qu'après fixation par une protéine il l'est beaucoup moins. (C) Principe de la mesure d'activité hélicase. La valeur de l'anisotropie est mesurée pour l'ADNdb sans protéine, puis avec protéine. Lorsque la réaction est déclenchée, la valeur de l'anisotropie diminue proportionnellement à la quantité de simple brin libéré. Le fluorophore est représenté en vert, la protéine par l'anneau bleu et les mouvements de l'ADN par les flèches jaunes.

#### ✦ Essais de fixation à l'ADN de *PabMCM*

Dans un volume de 70  $\mu$ l, 5nM de substrat ADN (double brin ou simple brin 88Y) ont été préalablement incubés à 55°C avec une solution tampon contenant 20 mM Tris-acetate pH 7,9, 50 mM potassium-acetate, 10 mM magnésium-acetate, 1 mM DTT et 0,01 mg/ml BSA. *PabMCM* était ensuite incorporé au mélange de manière successive pour obtenir des concentrations finales en hexamère de 0 ; 5,67 ; 13,08 ; 27,42 ; 40,31 ; 52,70 ; 76,09 ; 97,78 ; 117,96 ; 136,78 et 154,37 nM.

Après chaque ajout de protéines la valeur de l'anisotropie était mesurée trois fois ( $\lambda_{ex}=486\pm 1$  nm ;  $\lambda_{em}=524\pm 10$  nm) avant que l'ajout suivant ne soit réalisé. La valeur moyenne des mesures pour chaque point permet de tracer les courbes représentant le taux d'ADN fixé en fonction de la concentration en protéines. L'application du modèle de Hill sur ces données a permis de déterminer la constante d'équilibre de dissociation,  $K_D$ . Cette constante, ainsi que le nombre de Hill (n) qui caractérise le type d'affinité, ont été déterminés en ajustant l'équation de Hill aux points

expérimentaux :  $\%_{ADN \text{ fixé}} = \frac{[E]^n}{k_D^n + [E]^n} \times 100$ , où [E] désigne la concentration en enzymes.

#### ✦ Essais d'activité hélicase

De même que pour les mesures de fixation à l'ADN, 5 nM de substrat ADN double brin 88Y ont été préalablement incubés à 55 °C dans le tampon précisé ci-dessus. L'enzyme a ensuite été incorporée dans la cuve spectrofluorimétrique à la concentration indiquée sur les figures correspondantes. La réaction était déclenchée par l'ajout d'ATP à 6 mM. Pour chaque étape, des acquisitions d'anisotropie ont été réalisées. Un témoin négatif d'activité hélicase a été réalisé en substituant l'ATP par un volume équivalent d'eau. Les essais hélicases ont été menés dans 20 mM Tris-acetate pH 7,9, 50 mM potassium-acetate, 10 mM magnésium-acetate, 1 mM DTT et 0,01 mg/ml BSA.

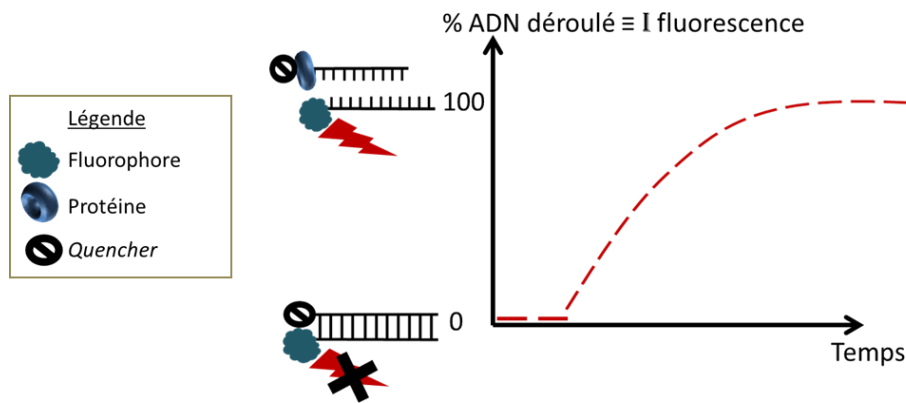
Afin de visualiser l'ADN déroulé en gel natif, 10 µl de la solution réactionnelle ont été prélevés en fin d'acquisition et mélangés à un tampon stop 5X à 10% Ficoll, 0,25% SDS et 0,1 M EDTA. L'échantillon a ensuite été déposé sur un gel de polyacrylamide à 8% et soumis à un courant de 130 V pendant 2 heures.

#### c) *QUENCHING DE FLUORESCENCE*

La seconde méthode de fluorescence utilisée, la mesure de *quenching* de fluorescence, repose sur la capacité d'une molécule appelée *quencher* (= extincteur) à inhiber un fluorophore se trouvant à proximité (quelques nanomètres). Le fluorophore transfère son excédant d'énergie au *quencher*, dont les niveaux d'énergie correspondent aux niveaux d'énergie supérieure du fluorophore, ce qui inhibe l'émission de photons. Ainsi, lorsque les deux molécules se retrouvent à proximité, la fluorescence est nulle.

Ce système est utilisé pour les tests de déplacements de brins d'ADN en fixant à l'extrémité d'un brin un fluorophore et à l'extrémité de l'autre brin, en face du fluorophore, le *quencher*. Tant que l'ADN est sous forme double brin, le fluorophore n'émet pas de photons, mais dès lors que les deux brins se trouvent séparés, le fluorophore ne peut plus transférer son énergie au *quencher*, il y a alors émission de photons. Le suivi de l'activité hélicase se fait donc par le suivi de l'augmentation de fluorescence (Figure 39), puisque l'ADN n'est fluorescent que sous la forme simple brin : plus il y a d'ADNs, plus la fluorescence est importante.





**Figure 39. Détection de l'activité hélicase par *quenching* de fluorescence.**

Principe de la mesure d'activité hélicase. Suivi du taux de déroulement de l'ADN après déclenchement de la réaction. La valeur de la fluorescence augmente proportionnellement à la quantité de simple brin libéré. Le fluorophore est représenté en vert, le *quencher* en noir et la protéine par l'anneau bleu.

#### ✦ Essais d'activité hélicase

Les tests d'activité hélicase en fluorescence ont été menés avec 5 nM d'ADN double brin 87L dans un volume réactionnel de 70  $\mu$ L. Les paramètres de réaction (température, tampon réactionnel) étaient les mêmes que ceux utilisés pour les expériences en anisotropie. Après ajout de l'enzyme, des mesures étaient réalisées jusqu'à stabilisation du signal, une moyenne de ces mesures correspondait à la valeur au temps dit  $t_0$ . La réaction était ensuite déclenchée par l'ajout de 6 mM ATP combinée si précisé à 50 nM de l'oligonucléotide *trap*. Aux temps  $t > t_0$ , la fluorescence a été mesurée durant une heure.

Le suivi de l'activité hélicase a été réalisé pour 35 nM, 75 nM et 120 nM de l'hélicase hexamérique PabMCM seule puis pour 75 nM avec en complément les partenaires protéiques. *PabGINS* (GINS-51/23) a été testé à 1125 nM, 1875 nM et 3750 nM de tétramères. Pour les autres expériences avec *PabGINS*, la concentration 1875 nM fut utilisée. Les tests avec *PabRecJ* ont été faits avec une concentration de 500 nM, tandis que les tests réalisés avec *PabPrimase* contenaient 75 nM de la protéine.

La valeur initiale de fluorescence ( $\lambda_{ex}=486\pm 0,5$  nm ;  $\lambda_{em}=524\pm 10$  nm) a été mesurée en mettant en présence l'ADNdb et la protéine ( $F_i$ ). Cette mesure a été faite au moins trois fois, afin d'une part d'avoir une valeur moyenne et d'autre part de déterminer l'intensité de fluorescence équivalente à 100% d'ADN déroulé ( $F_T$ ), l'ADNsb marqué a été incubé avec la protéine d'intérêt et la fluorescence mesurée. Ainsi, à l'aide de ces deux valeurs de fluorescence, après l'initiation de la réaction il a été possible de calculer pour chaque mesure de fluorescence ( $F_t$ ) la quantité équivalente d'ADN déroulé :

$$\% \text{ ADN déroulé} = \frac{F_t - F_i}{F_T - F_i}$$

### III. RÉSULTATS

#### 1. DU CLONAGE À LA PRODUCTION DE *PABXPD*

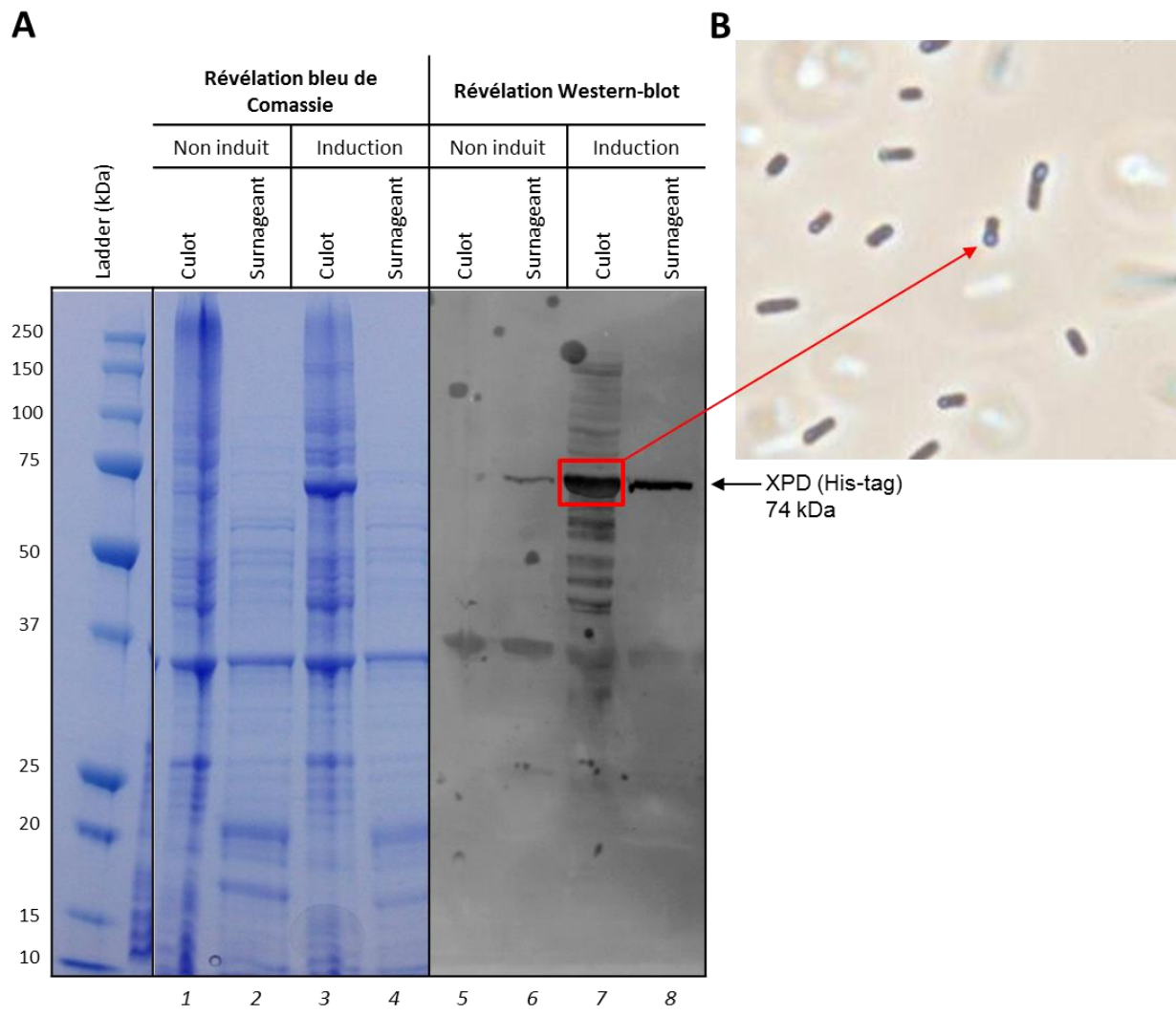
Les efforts ont été mis très rapidement sur XPD pour obtenir la version de *P. abyssi*. Le clonage de ce gène et son insertion dans des cellules d'expression ont été réalisés. La difficulté majeure rencontrée avec cette protéine recombinante a été sa solubilité. En effet, après traitement du culot cellulaire, la protéine d'intérêt XPD est présente dans le culot et non dans le surnageant (Figure 40.A). L'analyse des cellules de la souche *E. coli* au microscope révèle la présence de corps d'inclusion dans les cellules en phase d'induction (Figure 40.B). Ce phénomène est connu lors de la production de protéine recombinante, il correspond à une accumulation intracellulaire de la protéine d'intérêt exprimée sous forme d'agrégat car partiellement dénaturée.

##### ✦ **Modifier les conditions d'expression**

Divers paramètres ont été testés afin d'éviter la formation de corps d'inclusion en ralentissant le métabolisme des cellules : température, concentration en IPTG, durée d'induction. Différents facteurs pouvant améliorer la solubilité de la protéine ont également été expérimentés : tampons de lyse avec variation de salinité et de pH (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT), sonication, lyse chimique, culture en grand volume. La protéine d'intérêt a la particularité de posséder un cluster Fe-S essentiel à sa stabilité structurale. Des sulfates et des citrates de fer ont donc aussi été ajoutés au milieu de culture afin que l'élément fer ne soit pas manquant pour la protéine (Jaganaman et al, 2007). Tous ces paramètres n'ayant pas permis d'obtenir ne serait-ce qu'une faible quantité de protéine soluble, de l'expression *in vitro* grâce à un système RTS (Rapid Translation System) a été expérimenté mais sans réel succès au niveau des taux d'expression.

##### ✦ **Extraire les corps d'inclusion**

Après cette série d'essais infructueux, il a été tenté d'extraire et de purifier *PabXPD* depuis les corps d'inclusion. Le principe est d'extraire les corps d'inclusion des cellules, de les dénaturer avec un tampon contenant une forte concentration en urée puis de les injecter sur une colonne d'affinité pour la protéine avec un His-tag. Dans la colonne un tampon est injecté à débit constant sans urée pour permettre la resolubilisation de la protéine avant de l'éluer avec un gradient d'imidazole. Cette procédure, nous ayant permis de ne récupérer qu'une infime quantité de protéine *PabXPD* soluble, insuffisante pour une caractérisation, une autre approche encore différente a donc été menée.



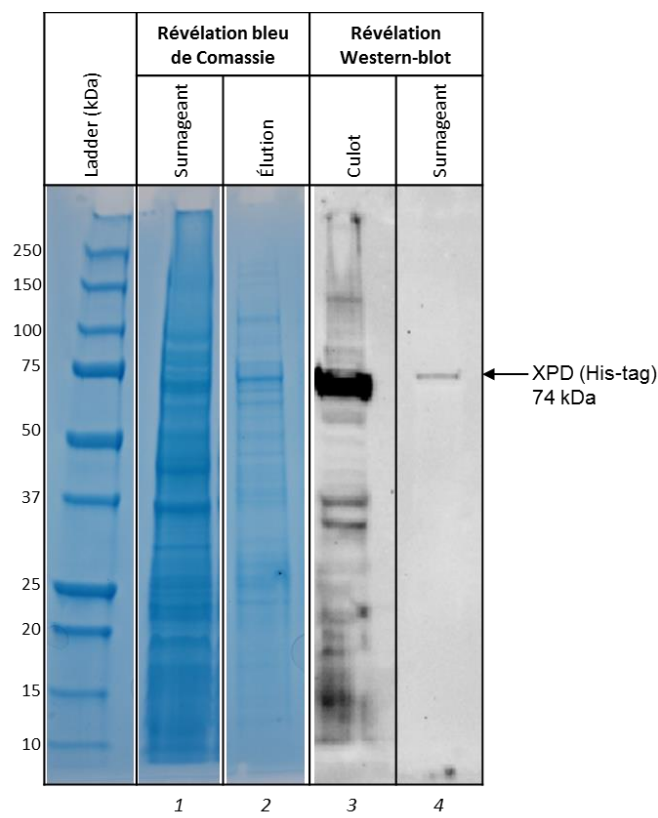
**Figure 40. Formation de corps d'inclusion dans *E. coli* après induction de la synthèse de *PabXPD*.**

(A) Migration des protéines en gel dénaturant SDS-PAGE contenues dans les cellules. La souche *E. coli* BL21 DE3 codon+RIL transformée avec le plasmide pET28a<sup>+</sup>/*PabXPD*, a été incubée à 25°C sur la nuit après induction à 1 mM IPTG. Un témoin négatif a été réalisé qui correspond à la culture de la souche mais sans la phase d'induction (1-2 et 5-6). Après la culture, le culot cellulaire récupéré est lysé pour en récupérer le contenu, après centrifugation un échantillon du culot et du surnageant sont déposés dans un puit du gel. Les protéines ont été révélées au bleu de Comassie (1 à 4) ou par Western-blot avec un anticorps dirigé contre le His-tag (5 à 8). (B) Observation au microscope de la souche *E. coli* BL21 DE3 codon+RIL en phase d'induction.

#### ✦ Utiliser des protéines chaperonnes

Une dénaturation partielle des protéines est à l'origine de la formation des corps d'inclusion au sein de la cellule car produite artificiellement chez *E. coli*, *PabXPD* ne dispose probablement pas des conditions favorables à son repliement. Pour tenter de palier à ce problème, le clone a de nouveau été transformé pour y incorporer un plasmide codant pour des protéines chaperonnes (pGroESL). Ces protéines, groES et groEL présentent chez les bactéries, ont pour mission d'assister dans leur repliement les protéines en cours de maturation pour leur permettre d'adopter leur conformation finale.

Leur production induite au même moment que la production de *PabXPD* devrait éviter la formation des agrégats précédemment observée. « Devrait », mais la majorité de la production est de nouveau précipitée avec les débris cellulaires après sonication. Toutefois une faible quantité correspondant à *PabXPD* est apparu dans le surnageant a pu être purifiée sur colonne de nickel (Figure 41). Au vu de la quantité obtenue après élution (piste 2 et 4), un travail d'optimisation des phases de production et de purification sera à venir pour espérer obtenir une quantité suffisante. En effet, faute de temps nous ne sommes pas allé plus loin dans cette direction pour focaliser la fin du travail de thèse sur la caractérisation du complexe MR/PCNA.



**Figure 41. *PabXPD* est présente sous forme soluble après expression avec les protéines chaperonnes.**

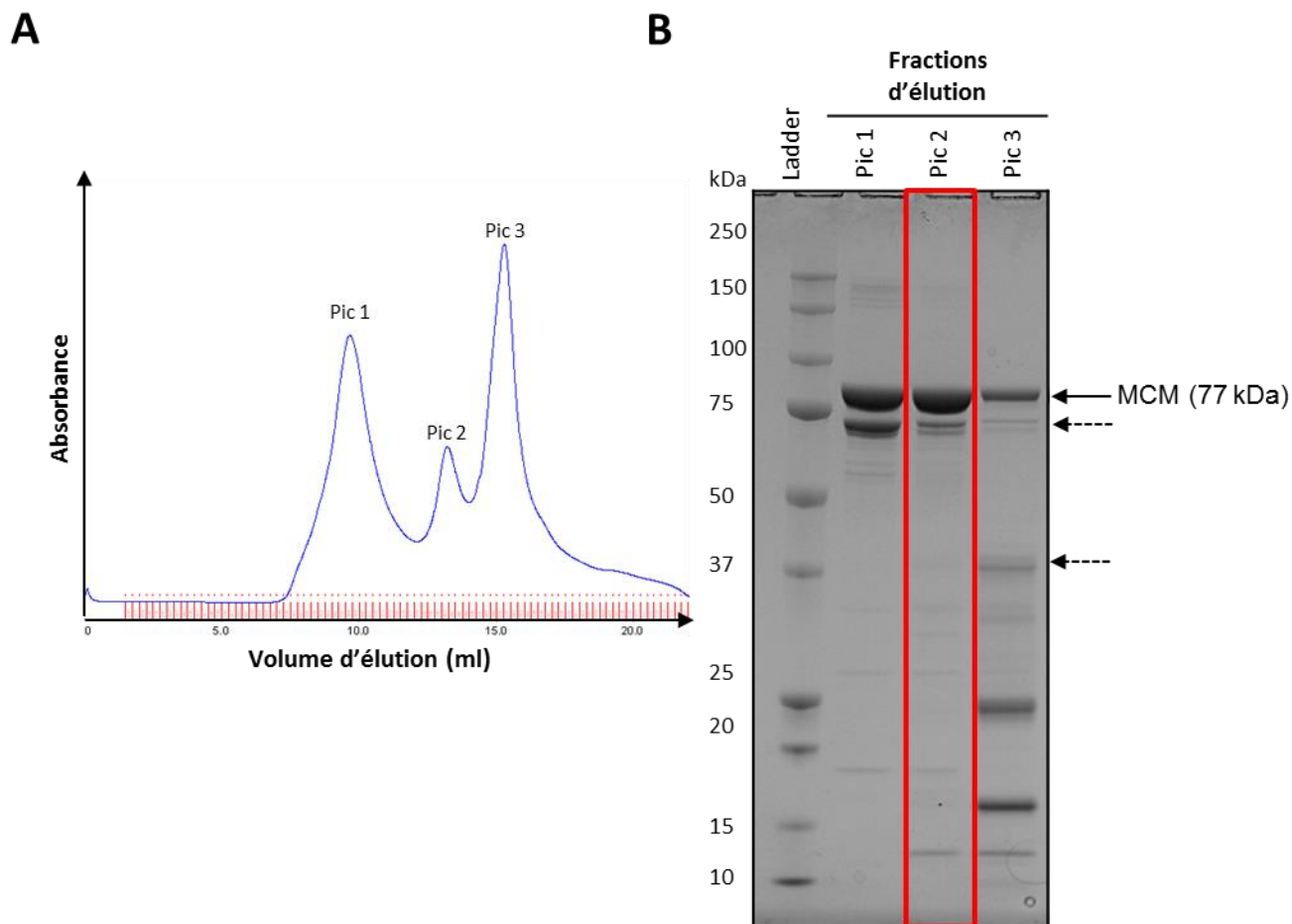
Analyse des échantillons dans le surnageant après lyse des cellules (pistes 1 et 3) et suite à l'élution de la protéine depuis la colonne de nickel (2 et 4). Les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie (pistes 1 et 2) ou par Western-blot avec un anticorps dirigé contre le His-tag (pistes 3 et 4).

## 2. CARACTÉRISATION DE *PAB*MCM

La protéine MCM est une hélicase décrite comme ayant une polarité 3'→5'. Jusqu'à présent, l'hélicase produite à partir du gène *mcm* de *P. abyssi* n'a donné aucun signe d'activité hélicase bien que sa fonction d'hydrolyse de l'ATP ait déjà été démontrée au laboratoire. Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser une méthode qui permette de suivre en temps réel les réactions d'ouverture de la double hélice d'ADN et d'obtenir des mesures d'activité plus fines que ce qui avait été réalisé précédemment au laboratoire. L'objectif était de mettre au point ces méthodes avec une hélicase fonctionnelle (hélicase commerciale) puis de tester l'activité hélicase de *Pab*MCM en présence de ses partenaires potentiels. Les résultats qui sont présentés dans cette étude ont été réalisés par Alexia Muguet dont j'ai assuré l'encadrement du stage M2.

### a) PURIFICATION DE L'HÉLICASE HEXAMÉRIQUE

La protéine MCM de *P. abyssi* a été purifiée à travers une colonne d'affinité retenant l'étiquette d'histidine (*His-tag*) dont elle est marquée puis par une étape de chromatographie d'exclusion par la taille, également appelée gel filtration. De façon étonnante, le chromatographe à l'étape de gel filtration montre que la protéine s'est éluée à trois volumes d'élution différents mais proches (Figure 42.A). L'hélicase étant connue pour s'oligomériser en hexamère et même en double hexamère, il est possible que ces trois pics correspondent à trois états d'oligomérisation de poids moléculaires différents. L'absence d'une gamme étalon pour évaluer le poids moléculaire correspondant à chacun des pics d'élution ne permet pas de statuer. Mais l'analyse en gel dénaturant des fractions d'élution confirme la présence de *Pab*MCM dans chacun de ces échantillons avec une prédominance dans les pics d'élution 1 et 2 (Figure 42.B). La protéine d'un poids moléculaire de 77 kDa a été purifiée avec des formes secondaires dont une majoritaire proche des 75 kDa. Une révélation par Western-blot a révélé que les produits de poids moléculaire supérieurs à 25 kDa correspondaient à MCM grâce aux anticorps dirigés contre l'hélicase. Une méthionine située en 47<sup>ème</sup> position dans la séquence protéique de *Pab*MCM pourrait être à l'origine d'un décalage de l'initiation de la traduction et générerait ainsi une forme tronquée de 71 kDa. Toutefois, dans le cas d'une aberration de l'initiation à cette autre méthionine, l'étiquette d'histidine positionnée en N-terminal de la protéine ne serait pas traduite avec la protéine. Or une autre révélation par Western-blot en utilisant cette fois-ci des anticorps anti-*His-tag* a également révélé cette forme secondaire suggérant sa présence. Les produits identifiés sur la figure par des flèches en pointillés seraient donc des formes de *Pab*MCM tronquées du côté C-terminal, une analyse en spectrométrie de masse permettrait de le vérifier. Pour l'ensemble des expériences, la protéine issue du Pic 2, a été utilisée car ayant une meilleure pureté apparente.



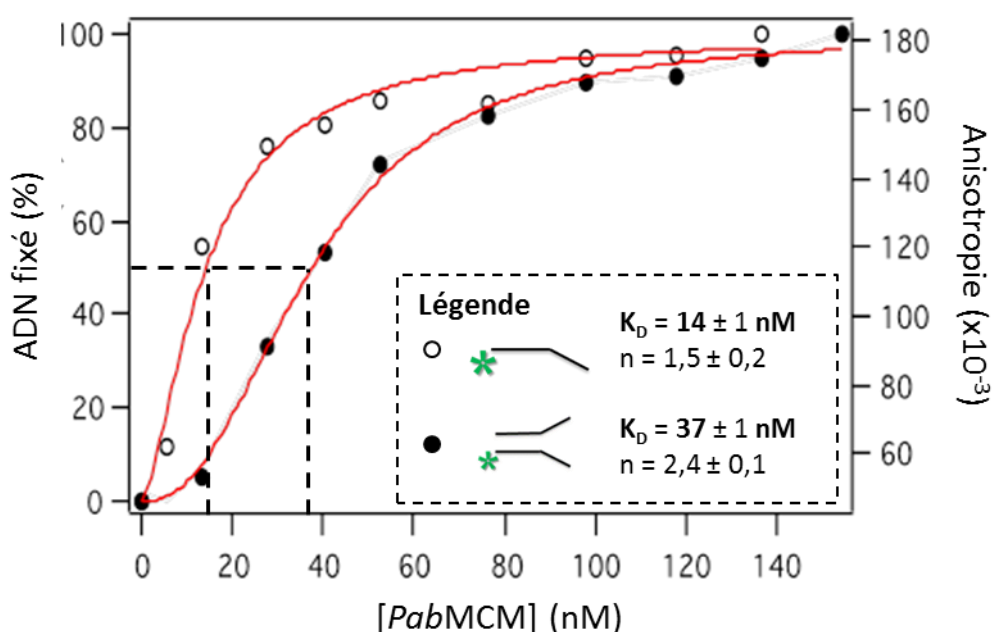
**Figure 42. Purification de *PabMCM*.**

(A) Profil d'élution de *PabMCM* après injection en colonne de gel filtration. Trois pics d'absorbance à 280 nm apparaissent majoritaires. (B) Analyse en gel SDS-PAGE des fractions d'élution correspondant aux trois pics d'absorbance intense illustrés en A. Dépôt de 5,5  $\mu$ g de protéine totale par échantillon. Les flèches en pointillées indiquent les formes tronquées de *PabMCM* révélées en Western-blot à la fois par un anticorps anti-MCM et un anticorps anti-His-tag. Encadré en rouge, l'échantillon utilisé pour l'ensemble des essais.

### b) PROPRIÉTÉS DE FIXATION À L'ADN

Sur un substrat ADN double brin de type fourche, la fixation de la protéine MCM a été mesurée par anisotropie de fluorescence. Pour ce faire, la solution tampon de réaction et l'ADNdb ont été placés dans la cuve de spectrofluorimétrie, à 55 °C, et la valeur d'anisotropie a été mesurée. Puis, au fur-et-à-mesure, de la protéine a été ajoutée dans la cuve et l'anisotropie mesurée à chaque fois. En Figure 43, une augmentation de l'anisotropie de fluorescence, et donc du taux d'ADN 88Ydb fixé, est observé, avec un maximum atteint vers 110 nM. L'allure de cette courbe correspond au modèle de Hill de fixation coopérative. Ceci est confirmé par la valeur du coefficient de Hill déterminée lorsque l'équation de Hill est appliquée aux données : un coefficient de Hill supérieur à « 1 » traduit une coopérativité de la fixation de l'enzyme sur son substrat, c'est-à-dire une amélioration de la fixation lorsque des protéines sont déjà fixées. Par ailleurs, l'équation de Hill permet de déterminer la

constante d'équilibre de dissociation,  $K_D$ , de l'enzyme pour son substrat. Cette constante correspond, ici, à la concentration d'enzyme nécessaire pour fixer 50% de l'ADN 88Ydb et est égale à  $37 \pm 1$  nM d'hexamères de *PabMCM* pour l'ADN double brin de type fourche. Cette affinité à des concentrations de l'ordre du nanomolaire reste cohérente avec les résultats obtenus pour l'hélicase MCM de *Thermoplasma acidophilum* ( $K_D = 166$  nM) (Haugland et al, 2009) et de *Sulfolobus solfataricus* ( $K_D = 50$  nM) (Pucci et al, 2007). De façon intéressante *PabMCM* a une meilleure affinité à l'ADN simple brin avec un  $K_D = 14 \pm 1$  nM ainsi qu'il a pu être observé par (Atanassova & Grainge, 2008). Ceci nous laisse supposer que sur un substrat ADN de type fourche, l'hélicase se fixerait préférentiellement sur la région simple brin avant de déshybrider la région double brin.



**Figure 43. Propriété de fixation de *PabMCM* à l'ADN simple et double brin.**

### c) DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ HÉLICASE

#### (1) PAR ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

Grâce à la mesure de l'anisotropie de fluorescence en solution, il est possible de suivre en simultanément la fixation à l'ADN ainsi que son déroulement, le tout dans un seul échantillon et en temps réel. Pour l'ensemble des essais présentés ici, le double brin 88Ydb a été employé en tant que substrat ADN pour les hélicases. La région hybridée de ses séquences est marquée en 3' par fluorophore sur le brin susceptible d'être relargué par l'action hélicase. La méthode a d'abord été mise au point en utilisant une hélicase produite commercialement avant de tester notre enzyme d'intérêt *PabMCM*.

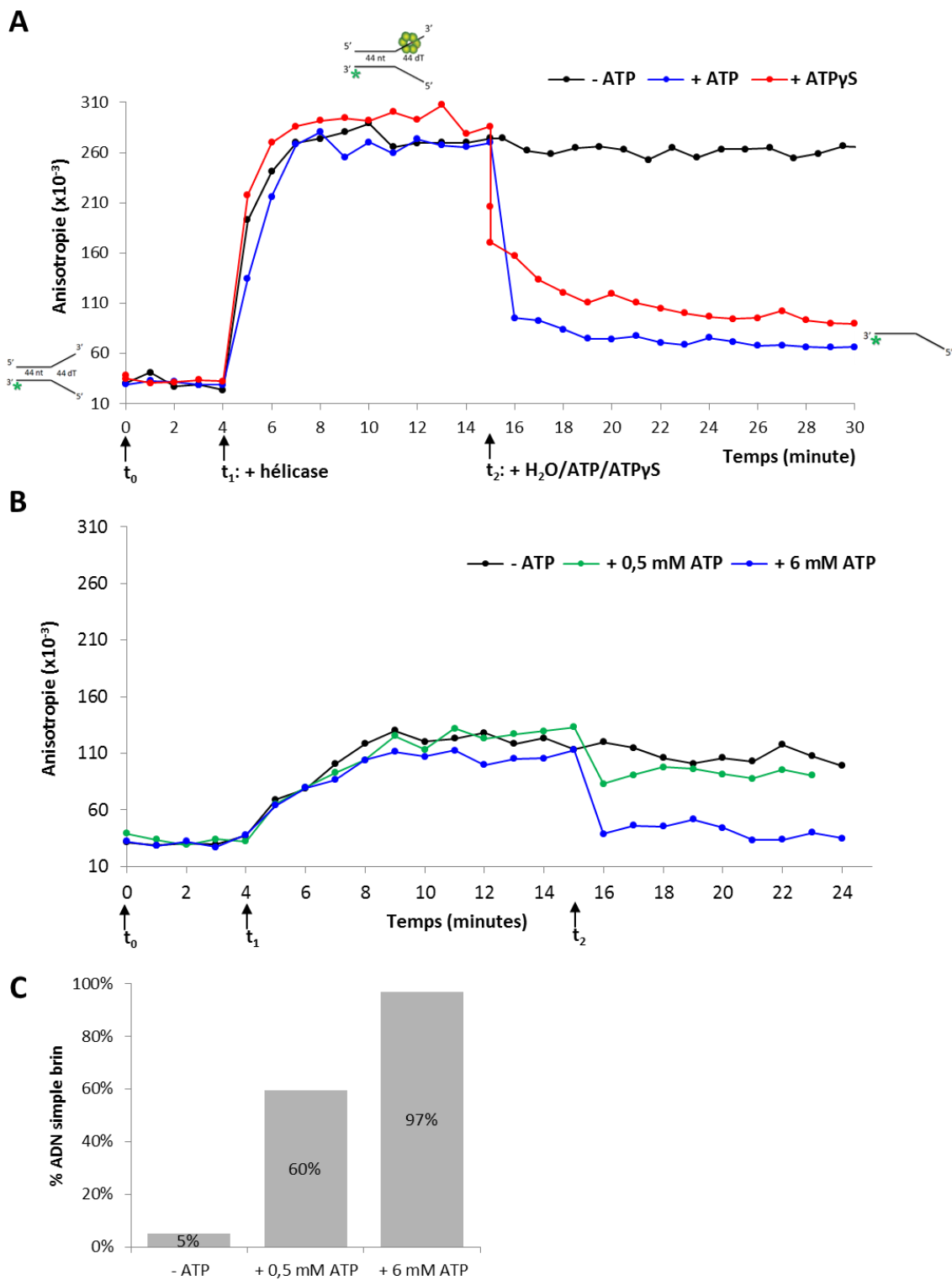
**✦ Mise au point**

L'hélicase thermostable UvrD (82,8 kDa) de *Thermoanaerobacter tengcongensis* provient d'un kit d'amplification hélicase-dépendante vendu par Biohelix®. Son activité de déroulement de l'ADN est de même polarité que PabMCM, c'est-à-dire 3'→5' (An et al, 2005). Dans la Figure 44.A, la valeur de l'anisotropie de fluorescence du substrat 88Ydb marqué a été suivie à partir de  $t_0 = 0$  min pour l'ADNdb seul puis après ajout de la protéine à 8 µg/ml (96,6 nM monomère) ( $t_1$ ). La fixation de la protéine à l'ADN s'est traduite par une augmentation de l'anisotropie comme attendu. Une fois atteint l'équilibre, de l'ATP à 6 mM final a été ajouté ( $t_2$ ) pour déclencher l'activité hélicase (courbe bleue). Ceci a eu pour conséquence une chute immédiate de l'anisotropie d'environ 70% ( $t = 16$  min), suivie d'une diminution plus lente d'environ 15% avant que la valeur ne se stabilise. Cet événement témoigne d'une libération de l'ADN des protéines, comme attendu, et serait donc lié à la séparation des deux brins d'ADN. L'expérience a été reconduite en ajoutant un volume équivalent d'eau à la place de l'ATP (courbe noire) mais aucune modification de la valeur d'anisotropie n'a été observée. Quant à l'ajout d'ATP $\gamma$ S (ATP modifié faiblement hydrolysable), celui-ci a provoqué une chute d'anisotropie sur les premières mesures puis une diminution relativement lente comparé à son homologue hydrolysable (courbe rouge). Ensemble ces résultats confirment que l'ATP était bien à l'origine de la chute des valeurs d'anisotropie, conséquence de la libération du brin marqué par l'activité hélicase.

Cependant, malgré l'efficacité de l'ajout d'ATP, la valeur de l'anisotropie n'est jamais redescendue au niveau ou en dessous de celle de l'ADNdb, ce qui peut indiquer que tout l'ADN 88Ydb n'a pas été déroulé. Avec une concentration plus faible en protéine il est possible d'avoir un retour de l'anisotropie à une valeur proche du  $t_0$  (Figure 44.B). Au vue de la chute d'anisotropie une minute après l'ajout d'ATP, le temps d'acquisition imposé par l'appareil à chaque mesure ne permet pas de décomposer en plusieurs points la cinétique réactionnelle. Une diminution de la concentration en ATP a été testée (0,5 mM) mais la vitesse de réaction initiale reste relativement élevée et en fin de réaction la valeur d'anisotropie n'atteint pas la valeur initiale de l'ADN, témoin que tous les brins d'ADN marqués ne sont pas dissociés de la protéine.

L'analyse des échantillons en fin de réaction sur gel natif prouve que plus de 90 % du substrat ADNdb a été déroulé après ajout de 6 mM ATP contre 60 % pour la condition à 0,5 mM ATP. Il y a donc bien eu un déroulement de l'ADN en conséquence de l'ajout d'ATP ; aussi, l'ATP étant un co-facteur essentiel à la fonction hélicase, ce déroulement est effectivement lié à l'action de l'hélicase UvrD.





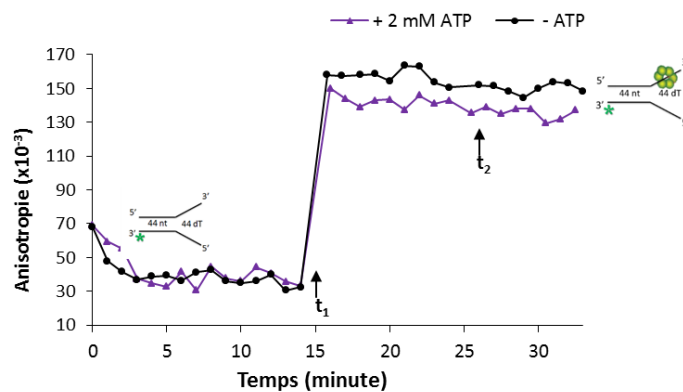
**Figure 44. Mesure de l'activité hélicase de l'enzyme commerciale par anisotropie de fluorescence.**

(A) Suivi de l'anisotropie de fluorescence du substrat ADN 88Ydb à partir de t<sub>0</sub> = 0 min. L'hélicase UvrD est incorporée à 8 µg/ml au temps t<sub>1</sub> = 4 min avant de déclencher la réaction à t<sub>2</sub> = 15 min par l'ajout de 6 mM ATP ou ATPyS ou un volume équivalent en H<sub>2</sub>O. (B) Pour 2 µg/ml d'hélicase (24,2 nM monomère), la quantité d'ATP était de 6 mM (courbe vert foncé) et de 0,5 mM (courbe vert clair), la courbe noire correspond à l'ajout d'H<sub>2</sub>O. (C) Pourcentage d'ADN simple brin formé après réaction en (B).

### ✦ Activité hélicase de *PabMCM*

D'après les résultats d'affinités de l'enzyme au substrat ADNdb, la concentration de 75 nM d'hexamères de protéines a été retenue pour étudier l'action hélicasique de *PabMCM*. Suite à la mise au point réalisée avec l'hélicase UvrD, la concentration a été choisie de sorte que la majorité de l'ADN 88Ydb soit fixée, mais pas la totalité, afin de limiter un excès de protéines en solution.

Mais l'ajout d'ATP n'a pas provoqué une diminution de l'anisotropie (Figure 45) contrairement à l'expérience précédente pour UvrD, et cela pour une gamme de concentration en ATP de 0,5 à 10 mM. L'analyse sur gel des échantillons issus de l'essai confirme l'absence d'ADN simple brin formé. En revenant sur les résultats de fixation à l'ADN, nous avons réalisé que l'affinité de *PabMCM* pour l'ADN simple brin pouvait rendre difficile la distinction d'anisotropie entre l'ADNsb marqué fixé et l'ADNdb fixé. A partir de là, il a donc été décidé de poursuivre l'étude en *quenching* de fluorescence.



**Figure 45. *PabMCM* ne déroule pas l'ADN 88Ydb après ajout de l'ATP.**

L'hélicase *PabMCM* est ajoutée à t = 15 min (75 nM) avec le substrat ADN 88Ydb et incubé à 55°C.

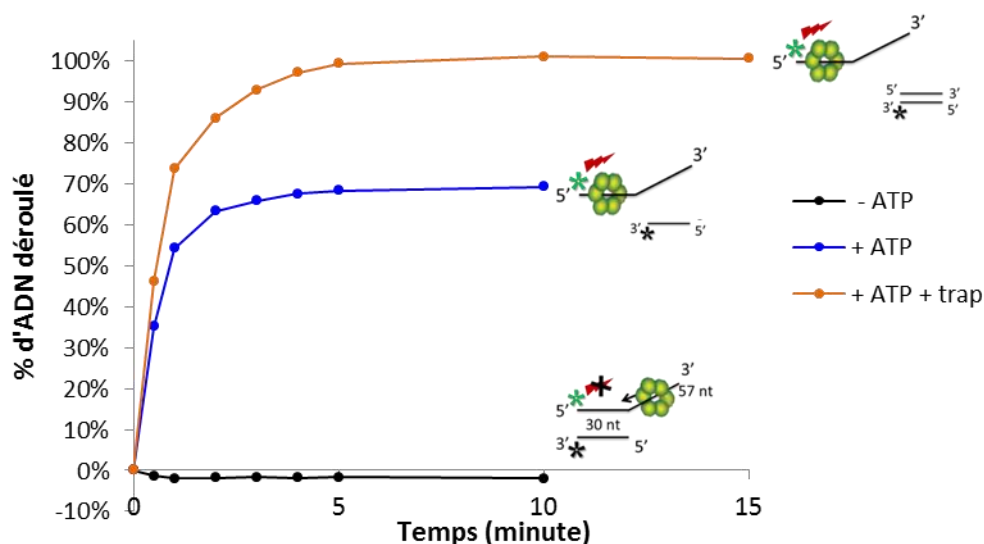
## (2) PAR QUENCHING DE FLUORESCENCE

Contrairement à la méthode précédente, le quenching de fluorescence permet de visualiser plus finement l'ouverture de la double hélice. Même si des protéines restent liées à l'ADNsb, l'action hélicase provoque l'éloignement entre le fluorophore et le *quencher* permettant de détecter l'émission de fluorescence du fluorophore. Pour cette technique, le substrat ADNdb 87L a été employé, celui-ci possède une extrémité 3' sortante favorable au chargement de l'hélicase *PabMCM*. Comme précédemment, une phase de mise au point a été faite en employant l'hélicase commerciale UvrD comme témoin positif.

### ✦ Mise au point des essais

En conservant les conditions retenues pour la technique d'anisotropie de fluorescence, un *trap* (oligonucléotide compétiteur) a été ajouté au moment d'incorporer l'ATP pour prévenir la réhybridation des deux brins d'ADN après le passage de l'hélicase. Après ajout de l'ATP, une

augmentation significative de la fluorescence a été relevée et corrélée au pourcentage d'ADN déroulé au cours du temps (Figure 46). La présence du trap dans l'essai améliore le rendement final d'ADN déroulé (courbe orange).



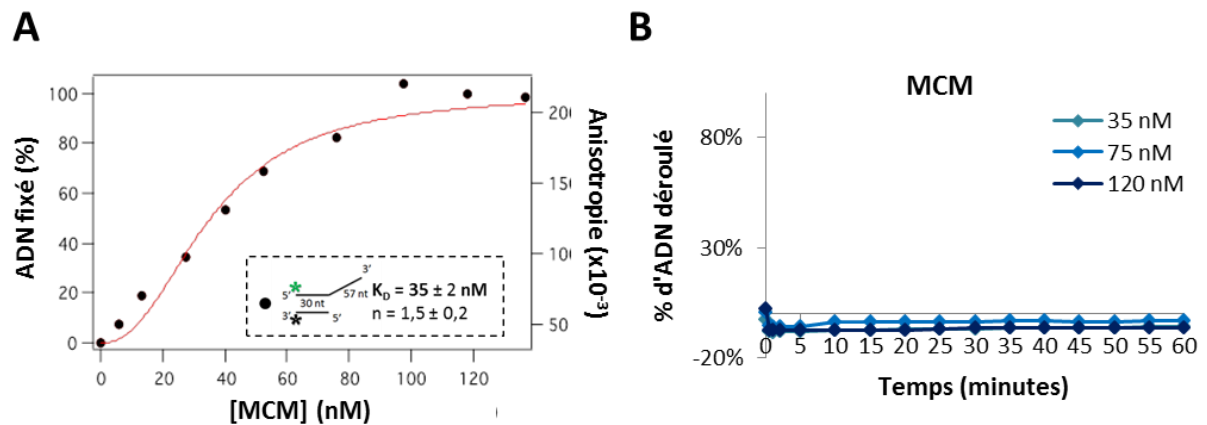
**Figure 46.** Suivi de l'activité hélicase UvrD en *quenching* de fluorescence.

Les essais ont été réalisés avec 2 µg/ml d'hélicase incubé préalablement avec l'ADNdb 87L. A  $t_0 = 0$  min, la réaction a été déclenchée par l'ajout de 6 mM d'ATP auquel été incorporé 50 nM de *trap* lorsqu'indiqué. Cette courte séquence s'hybride au brin covalentement liée au *quencher*.

#### ✦ Activité de *PabMCM*

Pour cette nouvelle expérience, l'affinité de *PabMCM* pour l'ADN 87Ldb a été déterminée par anisotropie de fluorescence (Figure 47.A). A partir de cette donnée, trois concentrations en hélicase hexamérique ont été utilisées pour les essais hélicases correspondant à 50 %, 80 % et 100 % d'ADNdb fixé. Après incubation de l'hélicase hexamérique à 55°C avec l'ADN (point  $t_0$ ), 3 mM d'ATP (Yoshimochi 2008) ont été ajoutés à la solution dans la cuve fluorimétrique pour déclencher la réaction et la fluorescence suivie durant 1 h. Pour les trois conditions testées, la fluorescence est restée au niveau de base (Figure 47.B) ne présentant pas de signe d'augmentation significative, contrairement à ce qui était visible avec l'hélicase commerciale.

Ces tests ont confirmé ce qui avait été précédemment observé au laboratoire, mais qui reste en contradiction avec la littérature sur MCM d'archées : l'hélicase *PabMCM* ne présente pas par elle-même d'activité *in-vitro*. Toutefois, il est connu que la présence d'autres protéines, dites partenaires ou cofacteurs, peut stimuler ou activer une enzyme.



**Figure 47. Actions de PabMCM sur l'ADNdb 87L.**

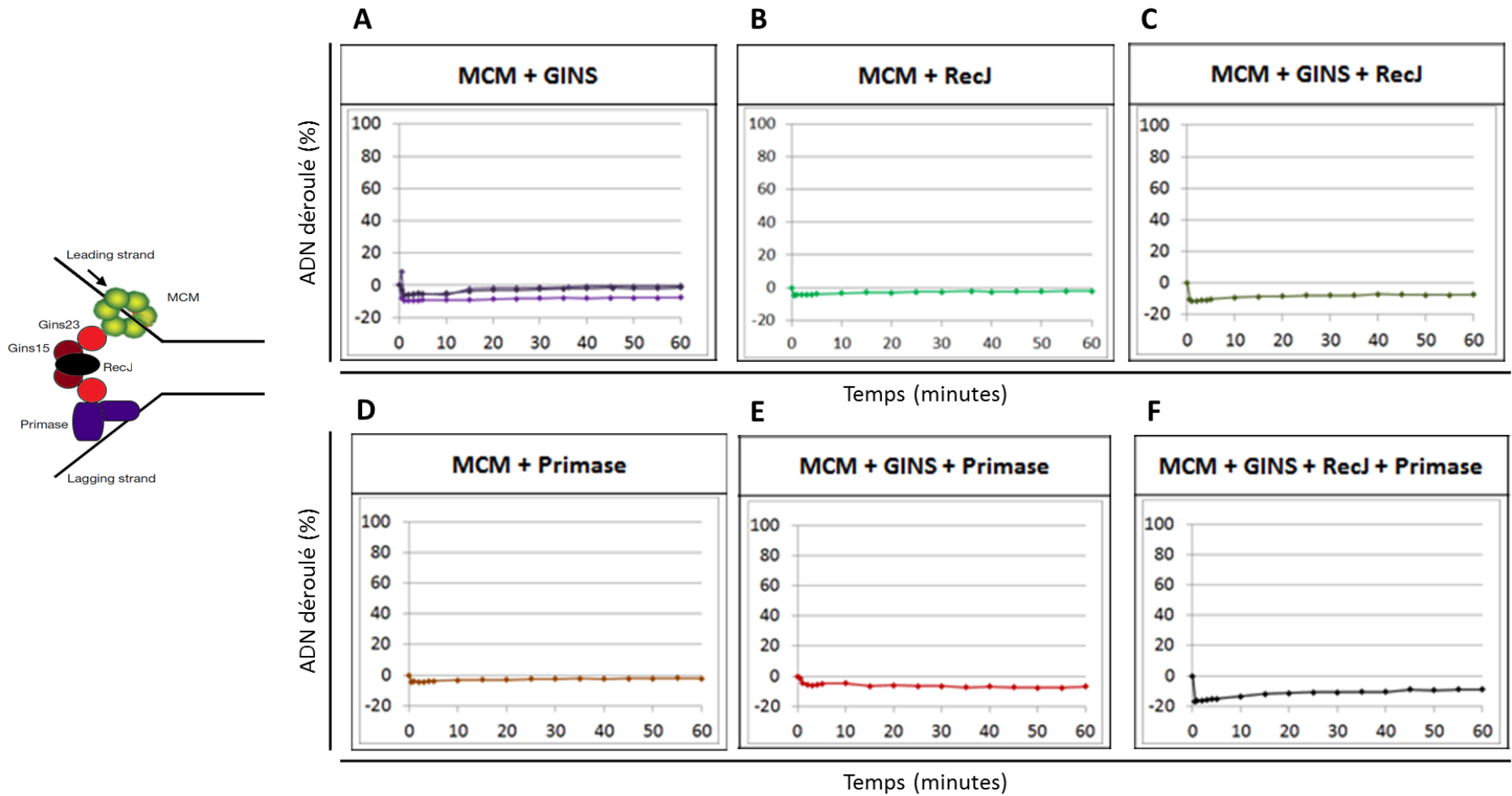
(A) Mesure par anisotropie de fluorescence de la fixation de l'enzyme à l'ADNdb 87L. (B) Suivi de l'activité hélicase de PabMCM par quenching de fluorescence. Aucune augmentation de la fluorescence n'est détectée après ajout de l'ATP à 3 mM et cela pour les trois concentrations de l'hexamère MCM (35, 75 et 120 nM). Le trap à 50 nM a été incorporé lors de l'ajout de l'ATP.

#### ✦ Utiliser un partenaire pour activer l'action hélicase de PabMCM ?

C'est parmi les protéines du complexe d'initiation de la réplication que des candidats pour interagir avec MCM ont été identifiés (Tableau 8). Ainsi, il a été montré que la présence de GINS stimulait l'activité hélicase et ATPase *in vitro* de PfuMCM (Lang & Huang, 2015; Yoshimochi et al, 2008). Il est même proposé que la forme active de la protéine MCM soit un complexe formé avec les GINS et une protéine associée aux GINS, Cdc45<sup>RecJ/GAN</sup> (Makarova et al, 2012). Chez l'archée *Sulfolobus solfataricus*, une interaction physique avec la primase DnaG a été mise en évidence (Bauer et al, 2013). Ainsi, afin de déterminer si PabMCM peut être activée par la présence de partenaires, le test d'activité hélicase en *quenching* de fluorescence a été reconduit en présence de partenaires potentiels de l'hélicase issus de *P. abyssi*.

Les GINS étant, par similitude avec *PfuMCM*, un partenaire prometteur pour stimuler l'hélicase, trois concentrations du complexe ont été testées dans un premier temps. Ces concentrations ont été choisies à partir de l'étude réalisée par Yoshimochi et *al.* sur *PfuMCM* et correspondent à des rapports MCM:GINs de 1:15, 1:25 et 1:50 (Yoshimochi et al, 2008). Le mode opératoire fut similaire à celui utilisé pour les tests avec *PabMCM* seul : l'hélicase (75 nM) a été incubée à 55 °C avec son substrat ADN avant l'ajout du partenaire, puis après une seconde incubation laissant les partenaires interagir, l'ATP a été ajouté et la variation de la fluorescence suivie pendant 1 heure. Les résultats de ce suivi, présentés sur la Figure 48.A et exprimés en pourcentage d'ADN déroulé au cours du temps, indiquent que quelle que soit la concentration testée aucune activité hélicase n'est détectable.

Ce résultat, bien que surprenant, n'est pas inattendu : le fonctionnement des protéines impliquées dans un complexe protéique fonctionnel n'est pas simple et il se peut qu'un partenaire supplémentaire soit nécessaire soit à l'activation des GINS pour stimuler MCM soit à l'activation du complexe. Pour cela, le partenaire potentiel de premier choix est la nucléase associée aux GINS,  $\text{RecJ}^{\text{Cdc45/GAN}}$ , puisqu'elle est hypothétiquement un élément essentiel à l'activité de l'hélicase. L'effet de la présence de cette protéine sur l'activité de *PabMCM* a été testé en présence ou non des GINS dont la concentration a été fixée au rapport 1:25. Mais comme précédemment, le taux d'ADN déroulé est resté à 0 (Figure 48.C). N'obtenant toujours pas de résultat, un autre partenaire a alors été testé. Il s'agit de la Primase, la première polymérase intervenant sur la fourche de réplication lors de l'initiation. Le mode opératoire fut le même que précédemment et l'action de la Primase (rapport MCM:Primase 1:1) sur l'activité de MCM fut testée en présence ou non de GINS et/ou RecJ. Peu importe la combinaison de protéines testée, le signal de fluorescence n'a pas augmenté et donc le taux d'ADN déroulé est resté nul (Figure 48.D à F).



**Figure 48. Activité hélicase de PabMCM en présence de partenaire(s).**

Suivi du taux de déroulement de l'ADN après l'ajout de 3 mM ATP. Pour les tests « MCM+GINS », trois concentrations du partenaire ont été testées : 1125, 1875 et 3750 nM. La concentration en RecJ était de 500 nM et celle de la Primase de 75 nM. Pour tous les tests avec partenaire(s) la concentration en MCM était de 75 nM hexamères.

## IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

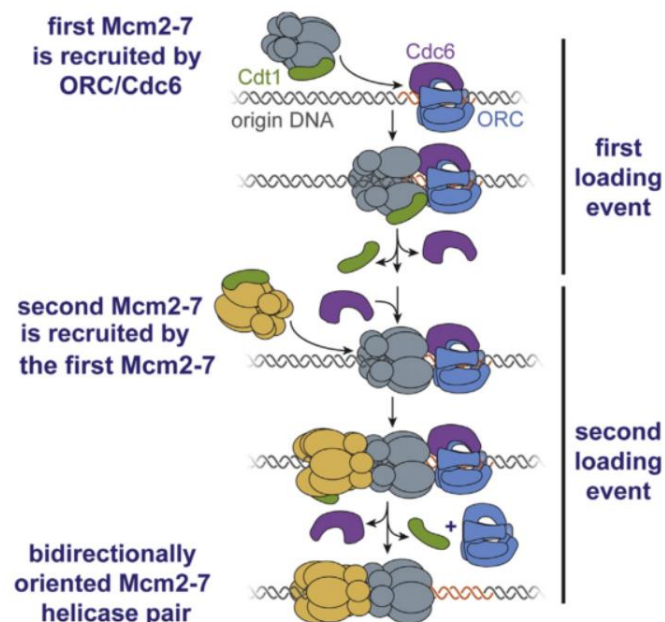
Cette étude avait pour objectif de caractériser l'interaction entre les deux hélicases de *P. abyssi* : l'hélicase répliquative MCM, et XPD.

À cette fin, deux approches de fluorescence ont été employées pour détecter l'activité hélicase de *PabMCM*. L'anisotropie et le *quenching* de fluorescence sont des techniques de plus en plus utilisées pour étudier les hélicases car elles peuvent permettre de découpler les mécanismes de fixation de la protéine à l'ADN et son activité de déroulement. Ces méthodes bien que fonctionnelles pour suivre l'activité hélicase de UvrD, n'ont pas permis de détecter ne serait-ce qu'un début de déroulement de l'ADN. *Mauvaises conditions réactionnelles, enzyme non fonctionnelle ou partenaire manquant ?*

Par anisotropie de fluorescence nous avons pu vérifier que la protéine dans ces conditions était capable de se fixer à l'ADN avec une propriété d'affinité cohérente avec ce qui avait déjà été décrit. La forme supposée active de MCM est de conformation hexamérique. Toutefois la conformation de l'hélicase *PabMCM* n'a pas été contrôlée après purification. Lors de l'étape de gel filtration (colonne d'exclusion par la taille), deux pics d'élution contenant majoritairement MCM ont été obtenus. De poids moléculaires différents, ces échantillons peuvent contenir des assemblages de MCM différent. Bien que ces deux échantillons aient été testés lors des essais fonctionnels, il serait intéressant de vérifier s'il s'agit bien d'une conformation hexamérique. En parallèle, extraire la protéine native de *P. abyssi* est à envisager pour vérifier son activité hélicase et ainsi la comparer à sa version recombinante.

Malgré l'ajout de partenaires potentiels dans le milieu réactionnel, la tentative d'activation de l'hélicase *PabMCM* par une autre protéine du complexe d'initiation de la réplication est restée infructueuse. Seule l'activité hélicase a été explorée dans cette étude, mais les partenaires peuvent aussi avoir une influence sur l'activité ATPase et la capacité de fixation à l'ADN de l'enzyme comme cela a pu être démontré avec les protéines Gins de *Sulfolobus solfataricus* (Lang & Huang, 2015). Lors de cette étude nous espérions étudier une autre hélicase, XPD dont l'interaction physique avec MCM avait été montrée chez *P. abyssi* (Pluchon et al, 2013). *PabXPD* a pu être clonée et son problème de solubilité a été partiellement résolu car sa production dans une souche contenant les protéines chaperonnes supplémentaires a permis de récupérer une fraction de la protéine soluble. Étonnement, des collègues travaillant sur cette même protéine de *Sulfolobus acidocaldarius* n'ont pas rencontré cette même difficulté avec des protocoles standards de clonage et d'expression dans *E. coli* (Rouillon & White, 2010). De même les équipes travaillant avec MCM de *Sulfolobus solfataricus* ont pu détecter son activité hélicase (Liew & Bell, 2011), bien que le pourcentage d'activité détecté reste extrêmement faible et que donc le suivi de son activité *in vitro* n'est pas en rapport avec les exigences de rapidité d'exécution dans un contexte physiologique. Cependant, une alternative pour étudier une interaction potentielle entre ces deux hélicases serait de s'y intéresser chez les *Sulfolobales*.

Enfin, des études publiées cette année soulèvent de nouvelles pistes de recherche sur les acteurs au chargement du complexe hélicase sur l'ADN et son activation. Ainsi en utilisant des techniques de fluorescences couplés aux analyses en molécule unique, l'équipe de Stephen Bell a pu reconstituer *in vitro* les étapes du chargement du double hexamère eucaryote Mcm2-7 (Figure 49) révélant un mécanisme différent entre les deux hélicases hexamériques avec une première phase de chargement d'un hexamère suivi du recrutement du second Mcm2-7 (Ticau et al, 2015). Le double hexamère ainsi formé est orienté dans les deux directions. Une détermination de la structure du double-hexamère MCM2-7 de la levure par cryo-microscopie électronique suggère un mécanisme concerté entre les deux hexamères pour déformer structurellement la double hélice d'ADN à l'interface des deux hélicases provoquant l'ouverture de l'origine de réplication (Li et al, 2015). En parallèle chez les bactéries, Bazin *et al.* ont montré que la séparation du dodécamère DnaB est provoqué par la primase DnaG ce qui conduit à la forme la plus active au niveau fonction hélicase, fixation à l'ADN et hydrolyse de l'ATP (Bazin et al, 2015). Lors des essais fonctionnels en quenching de fluorescence, la primase de *P. abyssi* avait été incorporée avec MCM toutefois sur une structure ADN simple brin 3'sortant. Il serait intéressant de se replacer dans un contexte de « bulle » de réplication pour essayer de détecter une activité de l'hélicase répllicative et l'effet de différents partenaires sur cette activité de déroulement de la double hélice.



**Figure 49. Chargement séquentiel des deux hélicases hexamériques eucaryotes Mcm2-7 (Ticau et al, 2015).**

D'après ce schéma, un hexamère de Mcm2-7 complexé avec Cdt1 serait d'abord recruté à l'origine de réplication par ORC/Cdc6 puis par une interaction entre les deux Mcm2-7, la seconde hélicase hexamérique serait chargée sur l'ADN. La formation du double hexamère précède la dissociation de Cdc6 et Cdt1.







## CONCLUSION GÉNÉRALE

---

Patchwork de processus et de machineries bactériens / eucaryotes avec des spécificités, les archées se sont révélées être de passionnants modèles pour l'étude de la maintenance génomique. Les processus qui assurent l'intégrité de l'information génétique, constituent un véritable puzzle dont toutes les pièces ne sont pas encore identifiées et dont des connections restent à définir. C'est dans un objectif de compréhension de ces connections que s'intègre ce travail de thèse et ceci à travers l'étude de deux nouvelles interactions entre protéines d'archées hyperthermophiles.

### **Ces interactions seraient-elles une spécificité des archées hyperthermophiles ?**

L'interaction entre PCNA et Mre11-Rad50 a été pour la première fois démontrée chez *P. furiosus* et le motif, probablement à l'origine de cette interaction (Mre11 PIP-like), est conservé parmi les Thermococcales, toutes des hyperthermophiles. Pour autant ce motif est absent chez *M. jannaschii* ( $T_{opt} = 83^{\circ}\text{C}$ ) et chez d'autres archées hyperthermophiles. De plus, la présence du PIP-motif canonique à l'extrémité C-terminale des séquences Mre11 de Methanosarcinales et Halobacterales ( $T_{opt}$  entre 25 et 50°C) suggère une interaction entre PCNA et le complexe MR qui ne serait donc pas à corrélérer avec une adaptation à la haute température. Étant donné la variabilité du PIP-motif et la difficulté à le détecter, il est maintenant à se demander si les protéines Mre11 d'autres espèces ne présentent pas également une région d'interaction au PCNA. Cette interaction pourrait à travers les branches du vivant être finalement plus répandue que ce que l'on imaginait.

Ceci est moins probable pour la seconde interaction étudiée ici : MCM/XPD. Celle-ci est à explorer dans le cadre d'une seconde énigme chez les archées: la présence, mais la non utilisation, des homologues eucaryotes du NER. La délétion de ces protéines chez deux archées *T. kodakarensis* et *S. islandicus* (Fujikane et al, 2010; Zhang et al, 2013) a un effet négligeable sur la survie des cellules exposées aux UVs et autres agents pathogènes alors qu'il s'agit d'une protéine indispensable à la voie de réparation du NER chez les eucaryotes. D'autre part, la protéine XPD des archées ne semble pas inclure dans le complexe du TFIIH ni reconnaître les lésions généralement réparées par le NER (Rudolf et al, 2009). Son interaction avec MCM était inattendue mais si elle s'avère confirmée, cela permettrait de proposer un rôle à XPD qui soit probablement spécifique aux archées.

### **PCNA est-il impliqué dans la recombinaison homologue chez les archées?**

Différentes études *in vivo* menées chez les eucaryotes montrent la localisation rapide du PCNA au niveau des sites endommagés de l'ADN y compris en cas de cassure double brin. Durant le processus de recombinaison homologue, le PCNA eucaryote intervient pour favoriser le recrutement et stimuler l'activité de l'exonucléase, Exo1 impliquée dans la résection des extrémités (Chen 2013). Pour *P. furiosus*, son interaction avec le complexe MR initiant la résection, va dans le sens d'une intervention aux cassures double brin. Bien que PCNA ne stimule pas l'activité exonucléase de MR, nous avons pu montrer qu'il interférait dans le mécanisme d'équilibre des activités endo- et exonucléases de MR pour provoquer une coupure propice au chargement des acteurs consécutifs du processus de recombinaison.

En plus de l'étape de résection, PCNA de part son interaction avec Hjc et Hel308<sup>Hjm</sup>, serait aussi impliqué dans l'étape de résolution des jonctions de Holliday (Dorazi et al, 2006; Fujikane et al, 2006). Il est donc très probable que le *sliding clamp* soit un acteur important du processus de recombinaison homologue chez les archées. En parallèle, des protéines telles que Mre11, Rad50 et RadA apparaissent comme essentielles pour la survie d'archées hyperthermophiles (Fujikane et al, 2010; Zhang et al, 2013) suggérant une implication de ces acteurs de la recombinaison à la fourche de réplication.

### **Vers un couplage des mécanismes de réplication et de réparation ?**

L'interaction du PCNA avec MR s'inscrit plus généralement dans un contexte où combiner la réplication avec des processus de réparation telle que la recombinaison trouve son importance pour permettre à la cellule d'agir rapidement et efficacement en cas de dommage durant la réplication. L'intérêt d'une telle interaction rejoint les différentes observations *in vivo* chez les eucaryotes concernant l'importance du complexe de la recombinaison dans le redémarrage du réplisome. Chez les archées hyperthermophiles, D. Grogan émet l'hypothèse que la fourche de réplication serve de détecteur à lésions de l'ADN pour que les acteurs de la réparation, progressant avec elle, interviennent directement (Grogan, 2015). Cette stratégie expliquerait à la fois, le rôle mineur des protéines du NER dans la reconnaissance des dommages, ainsi que l'essentialité de la machinerie de recombinaison pour permettre le relancement efficace du réplisome après chaque rupture de la fourche de réplication. Pour coupler ces mécanismes, PCNA en tant que plateforme de recrutement serait un excellent candidat. Mre11 et Hel308<sup>Hjm</sup> présentant le même motif d'interaction au PCNA, il est tentant d'imaginer un système de régulation permettant au PCNA d'interagir avec ces acteurs de la recombinaison *via* ce motif en cas d'arrêt de la fourche de réplication.

À l'inverse, l'étude menée par Hawkins *et al.* chez *H. volcanii*, suggère une initiation de la réplication à partir d'une bulle formée lors du procédé de recombinaison (Hawkins 2013, Michel & Bernander 2014). Les interactions entre les différents acteurs de ces deux mécanismes pourraient permettre le chargement des machineries respectives à la fourche de réplication ou à la structure formée durant la recombinaison.

À travers cette étude nous avons donc pu confirmer l'une des interactions dévoilée par le réseau de Pluchon *et al.* (2013). Ainsi comme le disait son auteur, le réseau s'est montré être un « générateur d'hypothèses » qui pour l'étude des archées se trouve être un outil très utile. À termes, ces données visent à améliorer la compréhension des mécanismes biomoléculaires opérant chez les archées.



## VALORISATION SCIENTIFIQUE

### **Publications :**

“Insights into physical and functional interplay between PCNA and Mre11/Rad50 complex from *Pyrococcus furiosus*.”

Hogrel, Laurent, Phung, Bossé, Pluchon, Lu, Clouet-d’Orval and Flament.

En cours d’écriture.

“Structure of the assembled PAN unfoldase reveals new insights into the molecular architecture and mode of action of proteasome regulatory ATPases.”

Ibrahim, Colombo, Hogrel, Flament, Härtle, Teixeira, Girard, Schoehn, Gabel and Franzetti.

En cours de soumission à Molecular Cell.

"An extended network of genomic maintenance in the archaeon *Pyrococcus abyssi* highlights unexpected associations between eucaryotic homologs.”

Pluchon, Fouqueau, Crezé, Laurent, Briffotiaux, Hogrel, Palud, Henneke, Godfroy, Hausner, Thomm, Nicolas and Flament.

PLoS One. 11/2013.

En parallèle de ce sujet de thèse, j’ai pu apporter une contribution à deux études dont les résultats ont été ou sont en cours de valorisation. Dans le cadre d’une collaboration avec l’équipe de B. Franzetti, nous nous sommes intéressés à un des composants du protéasome d’archée, la protéine PAN. J’ai ainsi été amenée à identifier PAN par western-blot dans des extraits cellulaires de *P. abyssi* et à comparer sa taille avec la protéine recombinante suivant la phase de croissance de l’archée. Cette donnée a été incluse dans l’article actuellement en cours de soumission par Ibrahim *et al.*

Tandis que durant mon stage de fin d’étude effectué dans ce même laboratoire, je m’étais déjà intéressée au réseau d’interactions des protéines de la maintenance génomique chez *P. abyssi*. À cette période où le réseau venait d’être révélé, des séries d’expériences ont été initiées pour renforcer certaines nouvelles interactions mises en évidence. Je m’étais ainsi focalisée sur la protéine de fixation à l’ADN simple brin, RPA avec laquelle j’avais réalisé des essais fonctionnels pour comprendre son implication dans la maturation des fragments d’Okasaki en partenariat avec Fen-1 et Dna2. Cette étude a été abordée dans l’article Pluchon *et al.*, 2013.

### **Conférences :**

03/2015: **GdR Archaea**, Toulouse, France. Poster: “Between DNA replication and DNA recombination: PCNA, a recruiter of Mre11/Rad50?” Gaëlle Hogrel, Sébastien Laurent and Didier Flament.

03/2015: **Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology**, DNA Replication and Recombination, Whistler, Canada. Poster: “Between DNA replication and DNA recombination: PCNA, a recruiter of Mre11/Rad50?” Gaëlle Hogrel, Sébastien Laurent and Didier Flament.

05/2014: **GdR Archaea / Molecular Biology of Archaea<sup>4</sup>**, Paris, France. Oral & Poster: “Between DNA replication and DNA recombination: PCNA, a recruiter of Mre11/Rad50?” Gaëlle Hogrel and Didier Flament.

06/2013 : **GT Archaea de la SFBBM**, Plouzané, France. Poster: “From interaction to function: characterization of unexpected protein associations to investigate genomic maintenance mechanisms in the hyperthermophilic archaea, *Pyrococcus abyssi*.” Gaëlle Hogrel, Audrey Bossé, Aline Perquis, Didier Flament.

### **Grand public :**

Juin 2014, **Journée portes ouvertes de l’Ifremer**: « Photocopier l’ADN en conditions extrêmes. »

Oct 2014, **Journée de l’EDSM**: « Les garagistes de l’extrême, plongée dans les mécanismes de réparation de l’ADN chez un micro-organisme des profondeurs. »

Sept 2014, **Nuit des Chercheurs à Océanopolis**: « Le Doctorat, une expérience faite d’expériences. »

Fév 2013, **Forum des doctorants MerSciDoc**: « Entre Abysses et ADN, ou comment utiliser un microorganisme isolé des profondeurs marines pour mieux comprendre les mécanismes liés à l’ADN. »







## TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1. Représentation schématique de la distribution des profondeurs océaniques. ....	14
Figure 2. La vie à proximité d'une cheminée hydrothermale profonde, des colonies de crevettes <i>Rimicaris exoculata</i> (A), et des vers <i>Riftia pachyptila</i> (B). Campagne Exomar 2005 – Site TAG (3650 m) (Ifremer).....	15
Figure 3. La thermophilie dans les trois domaines du vivant (Hickey & Singer, 2004). ....	17
Figure 4. L'arbre universel du vivant : version adaptée de l'arbre de Woese et al, 1990 et mise à jour par Forterre, 2015.....	18
Figure 5. La double hélice d'ADN.....	21
Figure 6. Processus de la Réplication de l'ADN.....	24
Figure 7. Synthèse des différentes lésions pouvant survenir sur l'ADN (Rass et al, 2012). ....	26
Figure 8. Trois voies de réparation des cassures double brin chez les eucaryotes : la recombinaison homologue (a), la ligature d'extrémités non homologues (b) et la ligature d'extrémité non homologues alternative (c) (Stracker & Petrini, 2011). ....	28
Figure 9. Présence des acteurs de la recombinaison homologue chez les archées (White, 2011).....	29
Figure 10. Réseau d'interactions protéines-protéines de la maintenance génomique chez <i>P. abyssi</i> (Pluchon et al, 2013). ....	32
Figure 11. Représentation de la diversité structurale du PCNA dans les trois domaines du vivant (Shin et al, 2014).....	36
Figure 12. Illustration du chargement du PCNA sur un substrat ADN type matrice/amorce (Ishino & Ishino, 2012).....	38
Figure 13. Interaction du PCNA humain avec le peptide p21 (Winter & Bunting, 2012). ....	38
Figure 14. Modèle 3D de l'assemblage du complexe PCNA-PolB1-Fen1-Lig1-ADN impliqué dans la maturation des fragments d'Okazaki de <i>Sulfolobus solfataricus</i> (Cannone et al, 2014).....	40
Figure 15. Représentations graphiques du complexe Mre11-Rad50.....	44
Figure 16. Le complexe humain Mre11-Rad50-Nbs1 adoptant plusieurs conformations.....	47
Figure 17. Déroulement local de l'extrémité d'ADN double brin par Mre11 (Tsutakawa et al, 2014). 50	
Figure 18. Modèle de résection initiée par le complexe MRX chez la levure (Cejka, 2015).....	52

Figure 19. Coopération du couple nucléase/hélicase NurA-HerA avec le complexe MR chez <i>P. furiosus</i> pour initier la recombinaison homologue (Hopkins & Paull, 2008).....	53
Figure 20. Rôle structural du complexe MR en cas de cassure double brin (A) ou de rupture de la fourche de réplication (B) (Williams et al, 2008).....	55
Figure 21. Profils électrophorétiques des protéines recombinantes en gel dénaturant.....	59
Figure 22. Dégradation du substrat ADN double brin par les activités nucléases de <i>PfuMR</i> . ....	61
Figure 23. L'ATP modifie le profil de résection du substrat $S_{46/50}$ par <i>PfuMR</i> . ....	62
Figure 24. Les activités nucléases sont favorisées par la présence des cations $Mn^{2+}$ et $Mg^{2+}$ .....	64
Figure 25. Activité endonucléase du complexe <i>PfuMR</i> sur le substrat ADNdb linéaire $S_{50/50}$ '.....	66
Figure 26. PCNA modifie le profil de résection généré par l'activité nucléase du complexe MR. ....	68
Figure 27. Action du peptide de Mre11 sur l'interaction fonctionnelle PCNA/MR. ....	102
Figure 28. Acquisition en temps réel de l'association du complexe <i>PfuMR</i> avec <i>PfuPCNA</i> . ....	105
Figure 29. Affinité du complexe MR et PCNA/MR pour l'ADN. ....	107
Figure 30. PCNA active la fonction nucléase de MR dans des conditions de salinité élevée.....	108
Figure 31. Illustration d'essais nucléases à réaliser pour, (A) s'assurer que le fragment de 27 nt visualisé au cours des essais correspond à de l'ADN simple brin et (B) contrôler que l'extrémité 3' n'est pas clivée. ....	112
Figure 32. Structure du MCM de <i>Sulfolobus solfataricus</i> .....	120
Figure 33. Structure et modélisation de XPD de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> . ....	123
Figure 34. Structure du complexe TFIIH .....	124
Figure 35. Ouverture de la double hélicase d'ADN par XPD et XPB dans la zone du dommage (Rouillon & White, 2010). ....	125
Figure 36. Schématisation d'une collision entre les complexes de réplication et transcription chez les eucaryotes (Lin & Pasero, 2012).....	127
Figure 37. Principe et mesure de fluorescence émise par un fluorophore.....	133
Figure 38. Détection d'une activité hélicase par anisotropie de fluorescence.....	135
Figure 39. Détection de l'activité hélicase par <i>quenching</i> de fluorescence.....	137
Figure 40. Formation de corps d'inclusion dans <i>E. coli</i> après induction de la synthèse de <i>PabXPD</i> . 139	
Figure 41. <i>PabXPD</i> est présente sous forme soluble après expression avec les protéines chaperonnes. ....	140

Figure 42. Purification de <i>PabMCM</i> .....	142
Figure 43. Propriété de fixation de <i>PabMCM</i> à l'ADN simple et double brin. ....	143
Figure 44. Mesure de l'activité hélicase de l'enzyme commerciale par anisotropie de fluorescence. 145	
Figure 45. <i>PabMCM</i> ne déroule pas l'ADN 88Ydb après ajout de l'ATP. ....	146
Figure 46. Suivi de l'activité hélicase UvrD en <i>quenching</i> de fluorescence. ....	147
Figure 47. Actions de <i>PabMCM</i> sur l'ADNdb 87L. ....	148
Figure 48. Activité hélicase de <i>PabMCM</i> en présence de partenaire(s). ....	150
Figure 49. Chargement séquentiel des deux hélicases hexamériques eucaryotes Mcm2-7 (Ticau et al, 2015). ....	152
Figure 50. Classification au sein du domaine des Archaea (Forterre, 2015). ....	181
Figure 51. Élution de <i>PfuMR</i> après injection dans une colonne de nickel. ....	182
Figure 52. Élution de <i>PfuMR#7.1</i> après injection dans la colonne Superdex. ....	182
Figure 53. Élution de <i>PfuMR#7.2</i> après injection dans la colonne Superdex. ....	183
Figure 54. Contrôle qualité des échantillons purifiés de <i>PfuMR</i> . ....	183
Figure 55. Profil de purification de <i>PfuPCNA</i> . ....	184
Figure 56. Pureté et stabilité du substrat ADNdb S1.....	185
Figure 57. Représentation schématique du phénomène de résonance plasmonique de surface. ....	186
Figure 58. Sensorgrammes pour une série de trois injections successives. ....	188
Figure 59. Modélisation de l'association des complexes <i>PfuMR<sup>link1</sup></i> et <i>PfuMR</i> à <i>PfuPCNA</i> . ....	191
Figure 60. Analyse d'immunodétection de <i>PabMCM</i> dans les fractions collectées après gel filtration. ....	192

Tableau 1. Quelques exemples d'extrêmophiles appartenant au domaine des <i>Archaea</i> . .....	16
Tableau 2. Caractéristiques de deux Euryarchées hyperthermophiles. ....	20
Tableau 3. Résumé des protéines impliquées dans la Réplication de l'ADN pour les trois domaines du vivant. D'après Kelman & Kelman, 2014. ....	25
Tableau 4. Délétion des gènes de la recombinaison chez des archées hyperthermophiles. D'après Grogan, 2015. ....	30
Tableau 5. Partenaires du PCNA répertoriés chez les Archaea (Pan et al, 2011). ....	42
Tableau 6. Activités enzymatiques du complexe MR et de ses homologues sur l'ADN simple et double brin. ....	48
Tableau 7. Construction des protéines recombinantes. ....	100
Tableau 8. Partenaires potentiels de MCM chez les Archaea. Schéma d'après Marinsek et al, 2006. ....	121
Tableau 9. Partenaires potentiels de <i>PabMCM</i> . ....	131
Tableau 10. Séquences ADN des substrats utilisés pour l'activité hélicase. ....	132
Tableau 11. Réactions à modéliser pour analyser la complexation PCNA/MR. ....	190

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**A**

An L, Tang W, Ranalli TA, Kim HJ, Wytiaz J, Kong H (2005) Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *J Biol Chem* 280: 28952-28958

Andres SN, Schellenberg MJ, Wallace BD, Tumbale P, Williams RS (2014) Recognition and repair of chemically heterogeneous structures at DNA ends. *Environmental and molecular mutagenesis*

Atanassova N, Grainge I (2008) Biochemical characterization of the minichromosome maintenance (MCM) protein of the crenarchaeote *Aeropyrum pernix* and its interactions with the origin recognition complex (ORC) proteins. *Biochemistry* 47: 13362-13370

Azvolinsky A, Dunaway S, Torres JZ, Bessler JB, Zakian VA (2006) The *S. cerevisiae* Rrm3p DNA helicase moves with the replication fork and affects replication of all yeast chromosomes. *Genes Dev* 20: 3104-3116

**B**

Bailey TL, Elkan C (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings / International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* 2: 28-36

Bartlett EJ, Brissett NC, Doherty AJ (2013) Ribonucleolytic resection is required for repair of strand displaced nonhomologous end-joining intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E1984-1991

Bauer RJ, Graham BW, Trakselis MA (2013) Novel interaction of the bacterial-Like DnaG primase with the MCM helicase in archaea. *J Mol Biol* 425: 1259-1273

Bazin A, Cherrier MV, Gutsche I, Timmins J, Terradot L (2015) Structure and primase-mediated activation of a bacterial dodecameric replicative helicase. *Nucleic Acids Res* 43: 8564-8576

Bell S (2009) DNA Replication in the Archaea: a Paradigm for Eukaryotic Replication. In *Molecular Themes in DNA Replication*, Cox LS (ed), 12. The Royal Society of Chemistry

Bergerat A, de Massy B, Gadelle D, Varoutas PC, Nicolas A, Forterre P (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386: 414-417

Bhaskara V, Dupre A, Lengsfeld B, Hopkins BB, Chan A, Lee JH, Zhang X, Gautier J, Zakian V, Paull TT (2007) Rad50 adenylate kinase activity regulates DNA tethering by Mre11/Rad50 complexes. *Mol Cell* 25: 647-661

Blackwood JK, Rzechorzek NJ, Abrams AS, Maman JD, Pellegrini L, Robinson NP (2012) Structural and functional insights into DNA-end processing by the archaeal HerA helicase-NurA nuclease complex. *Nucleic Acids Res* 40: 3183-3196

Blinov VM, Koonin EV, Gorbalenya AE, Kaliman AV, Kryukov VM (1989) 2 EARLY GENES OF BACTERIOPHAGE-T5 ENCODE PROTEINS CONTAINING AN NTP-BINDING SEQUENCE MOTIF AND PROBABLY INVOLVED IN DNA-REPLICATION, RECOMBINATION AND REPAIR. *FEBS letters* 252: 47-52

Bloch E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW, Stetter KO (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles : life under extreme conditions* 1: 14-21

Boal AK, Yavin E, Lukianova OA, O'Shea VL, David SS, Barton JK (2005) DNA-bound redox activity of DNA repair glycosylases containing [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry* 44: 8397-8407

Bochman ML, Schwacha A (2009) The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 652-683

Boisvert FM, Hendzel MJ, Masson JY, Richard S (2005) Methylation of MRE11 regulates its nuclear compartmentalization. *Cell cycle* 4: 981-989

Boubakri H, de Septenville AL, Viguera E, Michel B (2010) The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units in vivo. *EMBO J* 29: 145-157

Brewster AS, Wang G, Yu X, Greenleaf WB, Carazo JM, Tjajadi M, Klein MG, Chen XS (2008) Crystal structure of a near-full-length archaeal MCM: functional insights for an AAA+ hexameric helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20191-20196

Buechner CN, Heil K, Michels G, Carell T, Kisker C, Tessmer I (2013) Strand specific recognition of DNA damages by XPD provides insights into Nucleotide Excision Repair substrate versatility. *J Biol Chem*



Byrne RT, Schuller JM, Unverdorben P, Forster F, Hopfner KP (2014) Molecular architecture of the HerA-NurA DNA double-strand break resection complex. *FEBS letters* 588: 4637-4644

## C

Cann IK, Ishino S, Hayashi I, Komori K, Toh H, Morikawa K, Ishino Y (1999) Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerases in Archaea. *Journal of bacteriology* 181: 6591-6599

Cannavo E, Cejka P (2014) Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature*

Cannavo E, Cejka P, Kowalczykowski SC (2013) Relationship of DNA degradation by *Saccharomyces cerevisiae* Exonuclease 1 and its stimulation by RPA and Mre11-Rad50-Xrs2 to DNA end resection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E1661-1668

Cannon B, Kuhnlein J, Yang SH, Cheng A, Schindler D, Stark JM, Russell R, Paull TT (2013) Visualization of local DNA unwinding by Mre11/Rad50/Nbs1 using single-molecule FRET. *Proc Natl Acad Sci U S A*

Cannone G, Xu Y, Beattie TR, Bell SD, Spagnolo L (2014) The architecture of an Okazaki fragment-processing holoenzyme from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem J*

Cejka P (2015) DNA end resection: nucleases team up with the right partners to initiate homologous recombination. *J Biol Chem*

Chae J, Kim YC, Cho Y (2012) Crystal structure of the NurA-dAMP-Mn<sup>2+</sup> complex. *Nucleic Acids Res* 40: 2258-2270

Charmasson S, Sarradin PM, Le Faouder A, Agarande M, Luyen J, Desbruyeres D (2009) High levels of natural radioactivity in biota from deep-sea hydrothermal vents: a preliminary communication. *J Environ Radioact* 100: 522-526

Chen X, Kim IK, Honaker Y, Paudyal SC, Koh WK, Sparks M, Li S, Piwnicka-Worms H, Ellenberger T, You Z (2015) 14-3-3 Proteins Restrain the Exo1 Nuclease to Prevent Over-resection. *J Biol Chem*

Chen X, Paudyal SC, Chin RI, You Z (2013) PCNA promotes processive DNA end resection by Exo1. *Nucleic Acids Res*

Cheng K, Chen X, Xu G, Wang L, Xu H, Yang S, Zhao Y, Hua Y (2015) Biochemical and functional characterization of NurA-HerA complex from *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology*

Cohen GN, Barbe V, Flament D, Galperin M, Heilig R, Lecompte O, Poch O, Prieur D, Querellou J, Ripp R, Thierry JC, Van der Oost J, Weissenbach J, Zivanovic Y, Forterre P (2003) An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Microbiol* 47: 1495-1512

Compe E, Egly JM (2012) TFIID: when transcription met DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 343-354

Connelly JC, de Leau ES, Leach DRF (1999) DNA cleavage and degradation by the SbcCD protein complex from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 27: 1039-1046

Connelly JC, Kirkham LA, Leach DRF (1998) The SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7969-7974

Constantinesco F, Forterre P, Elie C (2002) NurA, a novel 5'-3' nuclease gene linked to rad50 and mre11 homologs of thermophilic Archaea. *Embo Reports* 3: 537-542

Constantinesco F, Forterre P, Koonin EV, Aravind L, Elie C (2004) A bipolar DNA helicase gene, herA, clusters with rad50, mre11 and nurA genes in thermophilic archaea. *Nucleic Acids Research* 32: 1439-1447

Costa A, Pape T, van Heel M, Brick P, Patwardhan A, Onesti S (2006) Structural studies of the archaeal MCM complex in different functional states. *J Struct Biol* 156: 210-219

Costanzo V, Robertson K, Bibikova M, Kim E, Grieco D, Gottesman M, Carroll D, Gautier J (2001) Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. *Mol Cell* 8: 137-147

Creze C, Ligabue A, Laurent S, Lestini R, Laptinok SP, Khun J, Vos MH, Czjzek M, Myllykallio H, Flament D (2012) Modulation of the *Pyrococcus abyssi* NucS endonuclease activity by replication clamp at functional and structural levels. *J Biol Chem* 287: 15648-15660

## D

Daley JM, Niu H, Miller AS, Sung P (2015) Biochemical mechanism of DSB end resection and its regulation. *DNA Repair (Amst)*

Das D, Moiani D, Axelrod HL, Miller MD, McMullan D, Jin KK, Abdubek P, Astakhova T, Burra P, Carlton D, Chiu HJ, Clayton T, Deller MC, Duan L, Ernst D, Feuerhelm J, Grant JC, Grzechnik A, Grzechnik SK, Han GW, Jaroszewski L, Klock

HE, Knuth MW, Kozbial P, Krishna SS, Kumar A, Marciano D, Morse AT, Nigoghossian E, Okach L, Paulsen J, Reyes R, Rife CL, Sefcovic N, Tien HJ, Trame CB, van den Bedem H, Weekes D, Xu Q, Hodgson KO, Wooley J, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Tainer JA, Wilson IA (2010) Crystal structure of the first eubacterial Mre11 nuclease reveals novel features that may discriminate substrates during DNA repair. *J Mol Biol* 397: 647-663

de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C (2001) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* 8: 1129-1135

de Jager M, Wyman C, van Gent DC, Kanaar R (2002) DNA end-binding specificity of human Rad50/Mre11 is influenced by ATP. *Nucleic Acids Research* 30: 4425-4431

Delmas S, Duggin IG, Allers T (2013) DNA damage induces nucleoid compaction via the Mre11-Rad50 complex in the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol* 87: 168-179

Dery U, Coulombe Y, Rodrigue A, Stasiak A, Richard S, Masson JY (2008) A glycine-arginine domain in control of the human MRE11 DNA repair protein. *Molecular and cellular biology* 28: 3058-3069

Desbruyères D (2010) *Les trésors des Abysses*.

Deshpande RA, Williams GJ, Limbo O, Williams RS, Kuhnlein J, Lee JH, Classen S, Guenther G, Russell P, Tainer JA, Paull TT (2014) ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling. *EMBO J*

Dirmeier R, Keller M, Hafenbradl D, Braun FJ, Rachel R, Burggraf S, Stetter KO (1998) *Thermococcus acidaminovorans* sp. nov., a new hyperthermophilic alkalophilic archaeon growing on amino acids. *Extremophiles : life under extreme conditions* 2: 109-114

Dobbs TA, Tainer JA, Lees-Miller SP (2010) A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation. *DNA Repair (Amst)* 9: 1307-1314

Dorazi R, Gotz D, Munro S, Bernander R, White MF (2007) Equal rates of repair of DNA photoproducts in transcribed and non-transcribed strands in *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* 63: 521-529

Dorazi R, Parker JL, White MF (2006) PCNA activates the Holliday junction endonuclease Hjc. *J Mol Biol* 364: 243-247

Dovrat D, Stodola JL, Burgers PM, Aharoni A (2014) Sequential switching of binding partners

on PCNA during in vitro Okazaki fragment maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*

Dubaele S, Proietti De Santis L, Bienstock RJ, Keriel A, Stefanini M, Van Houten B, Egly JM (2003) Basal transcription defect discriminates between xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy in XPD patients. *Mol Cell* 11: 1635-1646

## E

Eichler J, Adams MW (2005) Posttranslational protein modification in Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 393-425

Emptage K, O'Neill R, Solovyova A, Connolly BA (2008) Interplay between DNA polymerase and proliferating cell nuclear antigen switches off base excision repair of uracil and hypoxanthine during replication in archaea. *J Mol Biol* 383: 762-771

Erauso G, Reysenbach AL, Godfroy A, Meunier JR, Crump B, Partensky F, Baross JA, Marteinson V, Barbier G, Pace NR, Prieur D (1993) *Pyrococcus Abyssii* Sp-Nov, a New Hyperthermophilic Archaeon Isolated from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Archives of Microbiology* 160: 338-349

Eykelenboom JK, Blackwood JK, Okely E, Leach DR (2008) SbcCD causes a double-strand break at a DNA palindrome in the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Cell* 29: 644-651

## F

Fan L, Fuss JO, Cheng QJ, Arvai AS, Hammel M, Roberts VA, Cooper PK, Tainer JA (2008) XPD helicase structures and activities: insights into the cancer and aging phenotypes from XPD mutations. *Cell* 133: 789-800

Fiala G, Stetter K (1986) *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Archives of Microbiology* 145: 56-61

Finkelstein IJ, Greene EC (2009) XPD helicase speeds through a molecular traffic jam. *Mol Cell* 35: 549-550

Forterre P (2015) The universal tree of life: an update. *Frontiers in microbiology* 6: 717

Franzmann PD, Springer N, Ludwig W, Conway De Macario E, Rohde M (1992) A Methanogenic Archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 573-581

Fujikane R, Ishino S, Ishino Y, Forterre P (2010) Genetic analysis of DNA repair in the

hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*. *Genes Genet Syst* 85: 243-257

Fujikane R, Komori K, Shinagawa H, Ishino Y (2005) Identification of a novel helicase activity unwinding branched DNAs from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* 280: 12351-12358

Fujikane R, Shinagawa H, Ishino Y (2006) The archaeal Hjm helicase has recQ-like functions, and may be involved in repair of stalled replication fork. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 11: 99-110

## G

Gao Y, Nelson SW (2014) Autoinhibition of Bacteriophage T4 Mre11 (gp47) by its C-terminal domain. *J Biol Chem*

Garcia V, Phelps SE, Gray S, Neale MJ (2011) Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* 479: 241-244

Gardner AF, Bell SD, White MF, Prangishvili D, Krupovic M (2014) Protein-protein interactions leading to recruitment of the host DNA sliding clamp by the hyperthermophilic *Sulfolobus islandicus* rod-shaped virus 2. *Journal of virology* 88: 7105-7108

Gerard E, Jolivet E, Prieur D, Forterre P (2001) DNA protection mechanisms are not involved in the radioresistance of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* and *P. furiosus*. *Mol Genet Genomics* 266: 72-78

Gilljam KM, Feyzi E, Aas PA, Sousa MM, Muller R, Vagbo CB, Catterall TC, Liabakk NB, Slupphaug G, Drablos F, Krokan HE, Otterlei M (2009) Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif. *J Cell Biol* 186: 645-654

Gilljam KM, Muller R, Liabakk NB, Otterlei M (2012) Nucleotide excision repair is associated with the replisome and its efficiency depends on a direct interaction between XPA and PCNA. *PLoS one* 7: e49199

Giroux X, MacNeill SA (2015) A novel archaeal DNA repair factor that acts with the UvrABC system to repair mitomycin C-induced DNA damage in a PCNA-dependent manner. *Mol Microbiol*

Glud RN, Wenzhofer F, Middelboe M, Oguri K, Turnewitsch R, Canfield DE, Kitazato H (2013) High rates of microbial carbon turnover in sediments in the deepest oceanic trench on Earth. *Nat Geosci* 6: 284-288

Goodarzi AA, Jeggo PA (2013) The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Advances in genetics* 82: 1-45

Gorbalenya AE, Koonin EV (1990) Superfamily of UvrA-related NTP-binding proteins. Implications for rational classification of recombination/repair systems. *J Mol Biol* 213: 583-591

Grogan DW (2015) Understanding DNA Repair in Hyperthermophilic Archaea: Persistent Gaps and Other Reasons to Focus on the Fork. *Archaea* 2015: 942605

Grogan DW, Carver GT, Drake JW (2001) Genetic fidelity under harsh conditions: analysis of spontaneous mutation in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7928-7933

Groisillier A, Herve C, Jeudy A, Rebuffet E, Pluchon PF, Chevlot Y, Flament D, Geslin C, Morgado IM, Power D, Branno M, Moreau H, Michel G, Boyen C, Czjzek M (2010) MARINE-EXPRESS: taking advantage of high throughput cloning and expression strategies for the post-genomic analysis of marine organisms. *Microbial cell factories* 9: 45

Guilliam TA, Keen BA, Brissett NC, Doherty AJ (2015) Primase-polymerases are a functionally diverse superfamily of replication and repair enzymes. *Nucleic Acids Res* 43: 6651-6664

Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J (1996) Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell* 87: 297-306

Guy CP, Bolt EL (2005) Archaeal Hel308 helicase targets replication forks in vivo and in vitro and unwinds lagging strands. *Nucleic Acids Res* 33: 3678-3690

## H

Hashimoto Y, Puddu F, Costanzo V (2011) RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. *Nat Struct Mol Biol* 19: 17-24

Haugland GT, Rollor CR, Birkeland NK, Kelman Z (2009) Biochemical characterization of the minichromosome maintenance protein from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 13: 81-88

Henneke G (2012) In vitro reconstitution of RNA primer removal in Archaea reveals the existence of two pathways. *Biochem J* 447: 271-280

- Henneke G, Flament D, Hubscher U, Querellou J, Raffin JP (2005) The hyperthermophilic euryarchaeota *Pyrococcus abyssi* likely requires the two DNA polymerases D and B for DNA replication. *J Mol Biol* 350: 53-64
- Henneke G, Gueguen Y, Flament D, Azam P, Querellou J, Dietrich J, Hubscher U, Raffin JP (2002) Replication factor C from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi* does not need ATP hydrolysis for clamp-loading and contains a functionally conserved RFC PCNA-binding domain. *J Mol Biol* 323: 795-810
- Herdendorf TJ, Albrecht DW, Benkovic SJ, Nelson SW (2011) Biochemical Characterization of Bacteriophage T4 Mre11-Rad50 Complex. *Journal of Biological Chemistry* 286: 2382-2392
- Herdendorf TJ, Nelson SW (2014) Catalytic Mechanism of Bacteriophage T4 Rad50 ATP Hydrolysis. *Biochemistry*
- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual review of genetics* 44: 113-139
- Hickey DA, Singer GA (2004) Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. *Genome biology* 5: 117
- Hohl M, Kochanczyk T, Tous C, Aguilera A, Krezel A, Petrini JHJ (2015) Interdependence of the Rad50 Hook and Globular Domain Functions. *Molecular Cell* 57: 479-491
- Honda M, Park J, Pugh RA, Ha T, Spies M (2009) Single-molecule analysis reveals differential effect of ssDNA-binding proteins on DNA translocation by XPD helicase. *Mol Cell* 35: 694-703
- Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BA, Karcher A, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CT, Carney JP, Petrini JH, Tainer JA (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418: 562-566
- Hopfner KP, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP, Tainer JA (2001) Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105: 473-485
- Hopfner KP, Karcher A, Shin D, Fairley C, Tainer JA, Carney JP (2000a) Mre11 and Rad50 from *Pyrococcus furiosus*: cloning and biochemical characterization reveal an evolutionarily conserved multiprotein machine. *Journal of bacteriology* 182: 6036-6041
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA (2000b) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 101: 789-800
- Hopkins BB, Paull TT (2008) The *P. furiosus* mre11/rad50 complex promotes 5' strand resection at a DNA double-strand break. *Cell* 135: 250-260
- Huang Q, Li Y, Zeng C, Song T, Yan Z, Ni J, She Q, Shen Y (2015) Genetic analysis of the Holliday junction resolvases Hje and Hjc in *Sulfolobus islandicus*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 19: 505-514
- Huertas P (2010) DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* 17: 11-16
- I**
- Ishino Y, Ishino S (2012) Rapid progress of DNA replication studies in Archaea, the third domain of life. *Sci China Life Sci* 55: 386-403
- Ivanov EL, Korolev VG, Fabre F (1992) XRS2, A DNA-REPAIR GENE OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE, IS NEEDED FOR MEIOTIC RECOMBINATION. *Genetics* 132: 651-664
- Ivanov I, Chapados BR, McCammon JA, Tainer JA (2006) Proliferating cell nuclear antigen loaded onto double-stranded DNA: dynamics, minor groove interactions and functional implications. *Nucleic Acids Res* 34: 6023-6033
- J**
- Jaganaman S, Pinto A, Tarasev M, Ballou DP (2007) High levels of expression of the iron-sulfur proteins phthalate dioxygenase and phthalate dioxygenase reductase in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* 52: 273-279
- Jolivet E, L'Haridon S, Corre E, Forterre P, Prieur D (2003) *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 53: 847-851
- K**
- Kaplan DL, Davey MJ, O'Donnell M (2003) Mcm4,6,7 uses a "pump in ring" mechanism to unwind DNA by steric exclusion and actively translocate along a duplex. *J Biol Chem* 278: 49171-49182

- Kaplan DL, O'Donnell M (2004) Twin DNA pumps of a hexameric helicase provide power to simultaneously melt two duplexes. *Mol Cell* 15: 453-465
- Kasiviswanathan R, Shin JH, Kelman Z (2005) Interactions between the archaeal Cdc6 and MCM proteins modulate their biochemical properties. *Nucleic Acids Res* 33: 4940-4950
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88: 375-384
- Kelman LM, Kelman Z (2014) Archaeal DNA replication. *Annual review of genetics* 48: 71-97
- Komori K, Sakae S, Shinagawa H, Morikawa K, Ishino Y (1999) A Holliday junction resolvase from *Pyrococcus furiosus*: functional similarity to *Escherichia coli* RuvC provides evidence for conserved mechanism of homologous recombination in Bacteria, Eukarya, and Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8873-8878
- Kondo N, Nishikubo T, Wakamatsu T, Ishikawa H, Nakagawa N, Kuramitsu S, Masui R (2008) Insights into different dependence of dNTP triphosphohydrolase on metal ion species from intracellular ion concentrations in *Thermus thermophilus*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 12: 217-223
- Kuipers MA, Stasevich TJ, Sasaki T, Wilson KA, Hazelwood KL, McNally JG, Davidson MW, Gilbert DM (2011) Highly stable loading of Mcm proteins onto chromatin in living cells requires replication to unload. *J Cell Biol* 192: 29-41
- Kuper J, Braun C, Elias A, Michels G, Sauer F, Schmitt DR, Poterszman A, Egly JM, Kisker C (2014) In TFIIH, XPD Helicase Is Exclusively Devoted to DNA Repair. *PLoS Biol* 12: e1001954
- L**
- Lafrance-Vanasse J, Williams GJ, Tainer JA (2015) Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Progress in biophysics and molecular biology*
- Lakowicz J (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*.
- Lammens K, Bemeleit DJ, Mockel C, Clausing E, Schele A, Hartung S, Schiller CB, Lucas M, Angermuller C, Soding J, Strasser K, Hopfner KP (2011) The Mre11:Rad50 Structure Shows an ATP-Dependent Molecular Clamp in DNA Double-Strand Break Repair. *Cell* 145: 54-66
- Lang S, Huang L (2015) Sulfolobus GINS complex stimulates DNA binding and processive DNA unwinding by MCM. *Journal of bacteriology*
- Larmony S, Garnier F, Hoste A, Nada M (2015) A specific proteomic response of *Sulfolobus solfataricus* P2 to gamma radiations. *Biochimie*
- Le Breton M, Henneke G, Norais C, Flament D, Myllykallio H, Querellou J, Raffin JP (2007) The heterodimeric primase from the euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*: a multifunctional enzyme for initiation and repair? *J Mol Biol* 374: 1172-1185
- Le Bris N, Zbinden M, Gaill F (2005) Processes controlling the physico-chemical micro-environments associated with Pompeii worms. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 52: 1071-1083
- Lee JH, Paull TT (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex (vol 308, pg 551, 2005). *Science* 308: 1870-1870
- Lehmann AR (2008) XPD structure reveals its secrets. *DNA Repair (Amst)* 7: 1912-1915
- Lestini R, Delpech F, Myllykallio H (2015) DNA Replication Restart and cellular dynamics of Hef helicase/nuclease protein in *Haloferax volcanii*. *Biochimie*
- Li N, Zhai Y, Zhang Y, Li W, Yang M, Lei J, Tye BK, Gao N (2015) Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å. *Nature*
- Li Z, Huang RY, Yopp DC, Hileman TH, Santangelo TJ, Hurwitz J, Hudgens JW, Kelman Z (2014) A novel mechanism for regulating the activity of proliferating cell nuclear antigen by a small protein. *Nucleic Acids Res* 42: 5776-5789
- Li Z, Pan M, Santangelo TJ, Chemnitz W, Yuan W, Edwards JL, Hurwitz J, Reeve JN, Kelman Z (2011a) A novel DNA nuclease is stimulated by association with the GINS complex. *Nucleic Acids Res* 39: 6114-6123
- Li Z, Pan M, Santangelo TJ, Chemnitz W, Yuan W, Edwards JL, Hurwitz J, Reeve JN, Kelman Z (2011b) A novel DNA nuclease is stimulated by association with the GINS complex. *Nucleic Acids Research* 39: 6114-6123
- Li Z, Santangelo TJ, Cubonova L, Reeve JN, Kelman Z (2010) Affinity Purification of an Archaeal DNA Replication Protein Network. *Mbio* 1
- Liew LP, Bell SD (2011) The interplay of DNA binding, ATP hydrolysis and helicase activities of the archaeal MCM helicase. *Biochem J* 436: 409-414

- Lim CT, Lai PJ, Leach DR, Maki H, Furukohri A (2015) A novel mode of nuclease action is revealed by the bacterial Mre11/Rad50 complex. *Nucleic Acids Res*
- Lim HS, Kim JS, Park YB, Gwon GH, Cho Y (2011) Crystal structure of the Mre11-Rad50-ATPgammaS complex: understanding the interplay between Mre11 and Rad50. *Genes Dev* 25: 1091-1104
- Limbo O, Moiani D, Kertokalio A, Wyman C, Tainer JA, Russell P (2012) Mre11 ATLD17/18 mutation retains Tel1/ATM activity but blocks DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res* 40: 11435-11449
- Lin YL, Pasero P (2012) Interference between DNA replication and transcription as a cause of genomic instability. *Curr Genomics* 13: 65-73
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715
- Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R (2004) Choreography of the DNA damage response: Spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118: 699-713
- Liu L, Komori K, Ishino S, Bocquier AA, Cann IK, Kohda D, Ishino Y (2001) The archaeal DNA primase: biochemical characterization of the p41-p46 complex from *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* 276: 45484-45490
- Llorente B, Symington LS (2004) The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* 24: 9682-9694
- Lossouarn J, Dupont S, Gorlas A, Mercier C, Bienvenu N, Marguet E, Forterre P, Geslin C (2015) An abyssal mobilome: viruses, plasmids and vesicles from deep-sea hydrothermal vents. *Research in microbiology*
- Lydeard JR, Lipkin-Moore Z, Sheu YJ, Stillman B, Burgers PM, Haber JE (2010) Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly. *Genes Dev* 24: 1133-1144
- M**
- Maga G, Hubscher U (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116: 3051-3060
- Mailand N, Gibbs-Seymour I, Bekker-Jensen S (2013) Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 269-282
- Majka J, Alford B, Ausio J, Finn RM, McMurray CT (2011) ATP hydrolysis by RAD50 protein switches MRE11 enzyme from endonuclease to exonuclease. *J Biol Chem* 287: 2328-2341
- Makarova KS, Koonin EV, Kelman Z (2012) The CMG (CDC45/RecJ, MCM, GINS) complex is a conserved component of the DNA replication system in all archaea and eukaryotes. *Biology direct* 7: 7
- Marinsek N, Barry ER, Makarova KS, Dionne I, Koonin EV, Bell SD (2006) GINS, a central nexus in the archaeal DNA replication fork. *EMBO Rep* 7: 539-545
- Maser RS, Mirzoeva OK, Wells J, Olivares H, Williams BR, Zinkel RA, Farnham PJ, Petrini JH (2001) Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Molecular and cellular biology* 21: 6006-6016
- Matsumiya S, Ishino Y, Morikawa K (2001) Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: proliferating cell nuclear antigen from *Pyrococcus furiosus*. *Protein science : a publication of the Protein Society* 10: 17-23
- Matsunaga F, Takemura K, Akita M, Adachi A, Yamagami T, Ishino Y (2009) Localized melting of duplex DNA by Cdc6/Orc1 at the DNA replication origin in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 14: 21-31
- McGlynn P, Guy CP (2008) Replication forks blocked by protein-DNA complexes have limited stability in vitro. *J Mol Biol* 381: 249-255
- McNally R, Bowman GD, Goedken ER, O'Donnell M, Kuriyan J (2010) Analysis of the role of PCNA-DNA contacts during clamp loading. *BMC structural biology* 10: 3
- Mehta A, Haber JE (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6: a016428
- Meslet-Cladiere L, Norais C, Kuhn J, Briffotiaux J, Sloostra JW, Ferrari E, Hubscher U, Flament D, Myllykallio H (2007) A novel proteomic approach identifies new interaction partners for proliferating cell nuclear antigen. *J Mol Biol* 372: 1137-1148
- Mockel C, Lammens K, Schele A, Hopfner KP (2012) ATP driven structural changes of the bacterial Mre11:Rad50 catalytic head complex. *Nucleic Acids Research* 40: 914-927

Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665-679

Moreno-Herrero F, de Jager M, Dekker NH, Kanaar R, Wyman C, Dekker C (2005) Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* 437: 440-443

Naom IS, Morton SJ, Leach DR, Lloyd RG (1989) Molecular organization of sbcC, a gene that affects genetic recombination and the viability of DNA palindromes in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 17: 8033-8045

## O

Oakley GG, Tillison K, Opiyo SA, Glanzer JG, Horn JM, Patrick SM (2009) Physical interaction between replication protein A (RPA) and MRN: involvement of RPA2 phosphorylation and the N-terminus of RPA1. *Biochemistry* 48: 7473-7481

Ogino H, Ishino S, Haugland GT, Birkeland NK, Kohda D, Ishino Y (2014) Activation of the MCM helicase from the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum* by interactions with GINS and Cdc6-2. *Extremophiles : life under extreme conditions*

Oksenysh V, Bernardes de Jesus B, Zhovmer A, Egly JM, Coin F (2009) Molecular insights into the recruitment of TFIIH to sites of DNA damage. *EMBO J* 28: 2971-2980

Oren A, Ginzburg M, Ginzburg BZ, Hochstein LI, Volcani BE (1990) *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea. *International journal of systematic bacteriology* 40: 209-210

## P

Pan M, Kelman LM, Kelman Z (2011) The archaeal PCNA proteins. *Biochem Soc Trans* 39: 20-24

Pan M, Santangelo TJ, Cubonova L, Li Z, Metangmo H, Ladner J, Hurwitz J, Reeve JN, Kelman Z (2013) *Thermococcus kodakarensis* has two functional PCNA homologs but only one is required for viability. *Extremophiles : life under extreme conditions* 17: 453-461

Paull TT (2010) Making the best of the loose ends: Mre11/Rad50 complexes and Sae2 promote DNA double-strand break resection. *DNA Repair (Amst)* 9: 1283-1291

Paull TT, Deshpande RA (2014) The Mre11/Rad50/Nbs1 complex: Recent insights

into catalytic activities and ATP-driven conformational changes. *Experimental cell research*

Paull TT, Gellert M (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 1: 969-979

Paull TT, Gellert M (1999) Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Gene Dev* 13: 1276-1288

Paull TT, Lee JH (2014) Rad17, the clamp loader that loads more than clamps. *EMBO J* 33: 783-785

Peak MJ, Robb FT, Peak JG (1995) Extreme resistance to thermally induced DNA backbone breaks in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of bacteriology* 177: 6316-6318

Pedley AM, Lill MA, Davisson VJ (2014) Flexibility of PCNA-Protein Interface Accommodates Differential Binding Partners. *PLoS one* 9: e102481

Pidwirny M (2013) Ocean.

Pluchon PF, Fouqueau T, Creze C, Laurent S, Briffotiaux J, Hogrel G, Palud A, Henneke G, Godfroy A, Hausner W, Thomm M, Nicolas J, Flament D (2013) An Extended Network of Genomic Maintenance in the Archaeon *Pyrococcus abyssi* Highlights Unexpected Associations between Eucaryotic Homologs. *PLoS one* 8: e79707

Pucci B, De Felice M, Rocco M, Esposito F, De Falco M, Esposito L, Rossi M, Pisani FM (2007) Modular organization of the *Sulfolobus solfataricus* mini-chromosome maintenance protein. *J Biol Chem* 282: 12574-12582

## Q

Quaiser A, Constantinesco F, White MF, Forterre P, Elie C (2008) The Mre11 protein interacts with both Rad50 and the HerA bipolar helicase and is recruited to DNA following gamma irradiation in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *BMC Mol Biol* 9: 25

## R

Rass E, Grabarz A, Bertrand P, Lopez BS (2012) [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique* 16: 1-10

- Raymann K, Forterre P, Brochier-Armanet C, Gribaldo S (2014) Global phylogenomic analysis disentangles the complex evolutionary history of DNA replication in Archaea. *Genome biology and evolution*
- Reardon JT, Ge H, Gibbs E, Sancar A, Hurwitz J, Pan ZQ (1996) Isolation and characterization of two human transcription factor IIH (TFIIH)-related complexes: ERCC2/CAK and TFIIH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6482-6487
- Regal JA, Festerling TA, Buis JM, Ferguson DO (2013) Disease-associated MRE11 mutants impact ATM/ATR DNA damage signaling by distinct mechanisms. *Hum Mol Genet*
- Ren B, Kuhn J, Meslet-Cladiere L, Briffotiaux J, Norais C, Lavigne R, Flament D, Ladenstein R, Myllykallio H (2009) Structure and function of a novel endonuclease acting on branched DNA substrates. *The EMBO journal* 28: 2479-2489
- Richard DJ, Cubeddu L, Urquhart AJ, Bain A, Bolderson E, Menon D, White MF, Khanna KK (2011) hSSB1 interacts directly with the MRN complex stimulating its recruitment to DNA double-strand breaks and its endo-nuclease activity. *Nucleic Acids Res* 39: 3643-3651
- Robb FT, Maeder DL, Brown JR, DiRuggiero J, Stump MD, Yeh RK, Weiss RB, Dunn DM (2001) Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Methods in enzymology* 330: 134-157
- Rouillon C, Henneke G, Flament D, Querellou J, Raffin JP (2007) DNA polymerase switching on homotrimeric PCNA at the replication fork of the euryarchaea *Pyrococcus abyssi*. *J Mol Biol* 369: 343-355
- Rouillon C, White MF (2010) The XBP-Bax1 helicase-nuclease complex unwinds and cleaves DNA: implications for eukaryal and archaeal nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 285: 11013-11022
- Rudolf J, Makrantonis V, Ingledew WJ, Stark MJ, White MF (2006) The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol Cell* 23: 801-808
- Rudolf J, Rouillon C, Schwarz-Linek U, White MF (2009) The helicase XPD unwinds bubble structures and is not stalled by DNA lesions removed by the nucleotide excision repair pathway. *Nucleic Acids Res* 38: 931-941
- Rzechorzek NJ, Blackwood JK, Bray SM, Maman JD, Pellegrini L, Robinson NP (2015) Structure of the hexameric HerA ATPase reveals a mechanism of translocation-coupled DNA-end processing in archaea. *Nature communications* 5: 5506
- S**
- Saito Y, Komatsu K (2015) Functional Role of NBS1 in Radiation Damage Response and Translesion DNA Synthesis. *Biomolecules* 5: 1990-2002
- San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 77: 229-257
- Schleper C, Puehler G, Holz I, Gambacorta A, Janekovic D, Santarius U, Klenk HP, Zillig W (1995) *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *Journal of bacteriology* 177: 7050-7059
- Shibata A, Moiani D, Arvai AS, Perry J, Harding SM, Genois MM, Maity R, van Rossum-Fikkert S, Kertokallio A, Romoli F, Ismail A, Ismalaj E, Petricci E, Neale MJ, Bristow RG, Masson JY, Wyman C, Jeggo PA, Tainer JA (2013) DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. *Mol Cell*
- Shin DS, Pratt AJ, Tainer JA (2014) Archaeal Genome Guardians Give Insights into Eukaryotic DNA Replication and Damage Response Proteins. *Archaea* 2014: 206735
- Shin JH, Santangelo TJ, Xie Y, Reeve JN, Kelman Z (2007) Archaeal minichromosome maintenance (MCM) helicase can unwind DNA bound by archaeal histones and transcription factors. *J Biol Chem* 282: 4908-4915
- Shiraishi M, Ishino S, Yamagami T, Egashira Y, Kiyonari S, Ishino Y (2015) A novel endonuclease that may be responsible for damaged DNA base repair in *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* 43: 2853-2863
- Shroff R, Arbel-Eden A, Pilch D, Ira G, Bonner WM, Petrini JH, Haber JE, Lichten M (2004) Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Current Biology* 14: 1703-1711
- Shuman S, Glickman MS (2007) Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nature reviews Microbiology* 5: 852-861
- Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem* 76: 23-50



Slaymaker IM, Chen XS (2012) MCM Structure and Mechanics: What We Have Learned from Archaeal MCM. *Subcell Biochem* 62: 89-111

Slaymaker IM, Fu Y, Toso DB, Ranatunga N, Brewster A, Forsburg SL, Zhou ZH, Chen XS (2013) Mini-chromosome maintenance complexes form a filament to remodel DNA structure and topology. *Nucleic Acids Res* 41: 3446-3456

Soultanas P (2011) The replication-transcription conflict. *Transcription* 2: 140-144

Spang A, Saw JH, Jorgensen SL, Zaremba-Niedzwiedzka K, Martijn J, Lind AE, van Eijk R, Schleper C, Guy L, Ettema TJ (2015) Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521: 173-179

Stracker TH, Petrini JH (2011) The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 90-103

Symington LS (2014) End Resection at Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6

## T

Takeda K, Wada A, Yamamoto K, Moriyama Y, Aoki K (1989) Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment. *Journal of protein chemistry* 8: 653-659

Tercero JA, Labib K, Diffley JF (2000) DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *EMBO J* 19: 2082-2093

Thiel A, Michoud G, Moalic Y, Flament D, Jebbar M (2014) Genetic manipulations of the hyperthermophilic piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Applied and environmental microbiology* 80: 2299-2306

Ticau S, Friedman LJ, Ivica NA, Gelles J, Bell SP (2015) Single-Molecule Studies of Origin Licensing Reveal Mechanisms Ensuring Bidirectional Helicase Loading. *Cell*

Tittel-Elmer M, Alabert C, Pasero P, Cobb JA (2009) The MRX complex stabilizes the replisome independently of the S phase checkpoint during replication stress. *EMBO J* 28: 1142-1156

Tittel-Elmer M, Lengronne A, Davidson MB, Bacal J, Francois P, Hohl M, Petrini JH, Pasero P, Cobb JA (2012) Cohesin association to replication sites depends on rad50 and promotes fork restart. *Mol Cell* 48: 98-108

Tori K, Ishino S, Kiyonari S, Tahara S, Ishino Y (2013) A Novel Single-Strand Specific 3'-5' Exonuclease Found in the Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *PLoS one* 8: e58497

Trujillo KM, Sung P (2001) DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50\*Mrp11 complex. *J Biol Chem* 276: 35458-35464

Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY, Sung P (1998) Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mrp11, and p95. *J Biol Chem* 273: 21447-21450

Tsutakawa SE, Lafrance-Vanasse J, Tainer JA (2014) The cutting edges in DNA repair, licensing, and fidelity: DNA and RNA repair nucleases sculpt DNA to measure twice, cut once. *DNA Repair (Amst)*

## U

Ulrich HD, Takahashi T (2013) Readers of PCNA modifications. *Chromosoma* 122: 259-274

Uptain SM, Chamberlin MJ (1997) *Escherichia coli* RNA polymerase terminates transcription efficiently at rho-independent terminators on single-stranded DNA templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13548-13553

## V

van Brabant AJ, Stan R, Ellis NA (2000) DNA helicases, genomic instability, and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1: 409-459

Visser AR, O. (2010) Basic photophysics.

## W

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945-951

Walters AD, Chong JP (2010) An archaeal order with multiple minichromosome maintenance genes. *Microbiology* 156: 1405-1414

Wang Q, Goldstein M, Alexander P, Wakeman TP, Sun T, Feng J, Lou Z, Kastan MB, Wang XF (2014) Rad17 recruits the MRE11-RAD50-NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks. *EMBO J* 33: 862-877

Warbrick E (1998) PCNA binding through a conserved motif. *BioEssays : news and reviews in*

*molecular, cellular and developmental biology* 20: 195-199

Warbrick E (2000) The puzzle of PCNA's many partners. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22: 997-1006

Wei T, Zhang S, Zhu S, Sheng D, Ni J, Shen Y (2008) Physical and functional interaction between archaeal single-stranded DNA-binding protein and the 5'-3' nuclease NurA. *Biochemical and biophysical research communications* 367: 523-529

White MF (2003) Archaeal DNA repair: paradigms and puzzles. *Biochem Soc Trans* 31: 690-693

White MF (2011) Homologous recombination in the archaea: the means justify the ends. *Biochem Soc Trans* 39: 15-19

Williams GJ, Williams RS, Williams JS, Moncalian G, Arvai AS, Limbo O, Guenther G, SilDas S, Hammel M, Russell P, Tainer JA (2011) ABC ATPase signature helices in Rad50 link nucleotide state to Mre11 interface for DNA repair. *Nat Struct Mol Biol* 18: 423-431

Williams RS, Moncalian G, Williams JS, Yamada Y, Limbo O, Shin DS, Grocock LM, Cahill D, Hitomi C, Guenther G, Moiani D, Carney JP, Russell P, Tainer JA (2008) Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell* 135: 97-109

Winkler GS, Araujo SJ, Fiedler U, Vermeulen W, Coin F, Egly JM, Hoeijmakers JH, Wood RD, Timmers HT, Weeda G (2000) TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA repair. *J Biol Chem* 275: 4258-4266

Winter JA, Bunting KA (2012) Rings in the extreme: PCNA interactions and adaptations in the archaea. *Archaea* 2012: 951010

Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5088-5090

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4576-4579

Wolski SC, Kuper J, Hanzelmann P, Truglio JJ, Croteau DL, Van Houten B, Kisker C (2008) Crystal structure of the FeS cluster-containing nucleotide excision repair helicase XPD. *PLoS Biol* 6: e149

## X

Xi XG, Deprez E (2010) Monitoring helicase-catalyzed DNA unwinding by fluorescence anisotropy and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Methods* 51: 289-294

Xu H, Zhang P, Liu L, Lee MY (2001) A novel PCNA-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *Biochemistry* 40: 4512-4520

## Y

Yavin E, Stemp ED, O'Shea V L, David SS, Barton JK (2006) Electron trap for DNA-bound repair enzymes: a strategy for DNA-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3610-3614

Yoshimochi T, Fujikane R, Kawanami M, Matsunaga F, Ishino Y (2008) The GINS complex from *Pyrococcus furiosus* stimulates the MCM helicase activity. *J Biol Chem* 283: 1601-1609

## Z

Zakharyevich K, Ma Y, Tang S, Hwang PY, Boiteux S, Hunter N (2010) Temporally and biochemically distinct activities of Exo1 during meiosis: double-strand break resection and resolution of double Holliday junctions. *Mol Cell* 40: 1001-1015

Zeng X, Birrien JL, Fouquet Y, Cherkashov G, Jebbar M, Querellou J, Oger P, Cambon-Bonavita MA, Xiao X, Prieur D (2009) *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *The ISME journal* 3: 873-876

Zhang C, Tian B, Li S, Ao X, Dalgaard K, Gokce S, Liang Y, She Q (2013) Genetic manipulation in *Sulfolobus islandicus* and functional analysis of DNA repair genes. *Biochem Soc Trans* 41: 405-410

Zhou Y, Caron P, Legube G, Paull TT (2013) Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Res*



## ANNEXES

---

# ANNEXE 1 : DOMAINE DES ARCHAEA

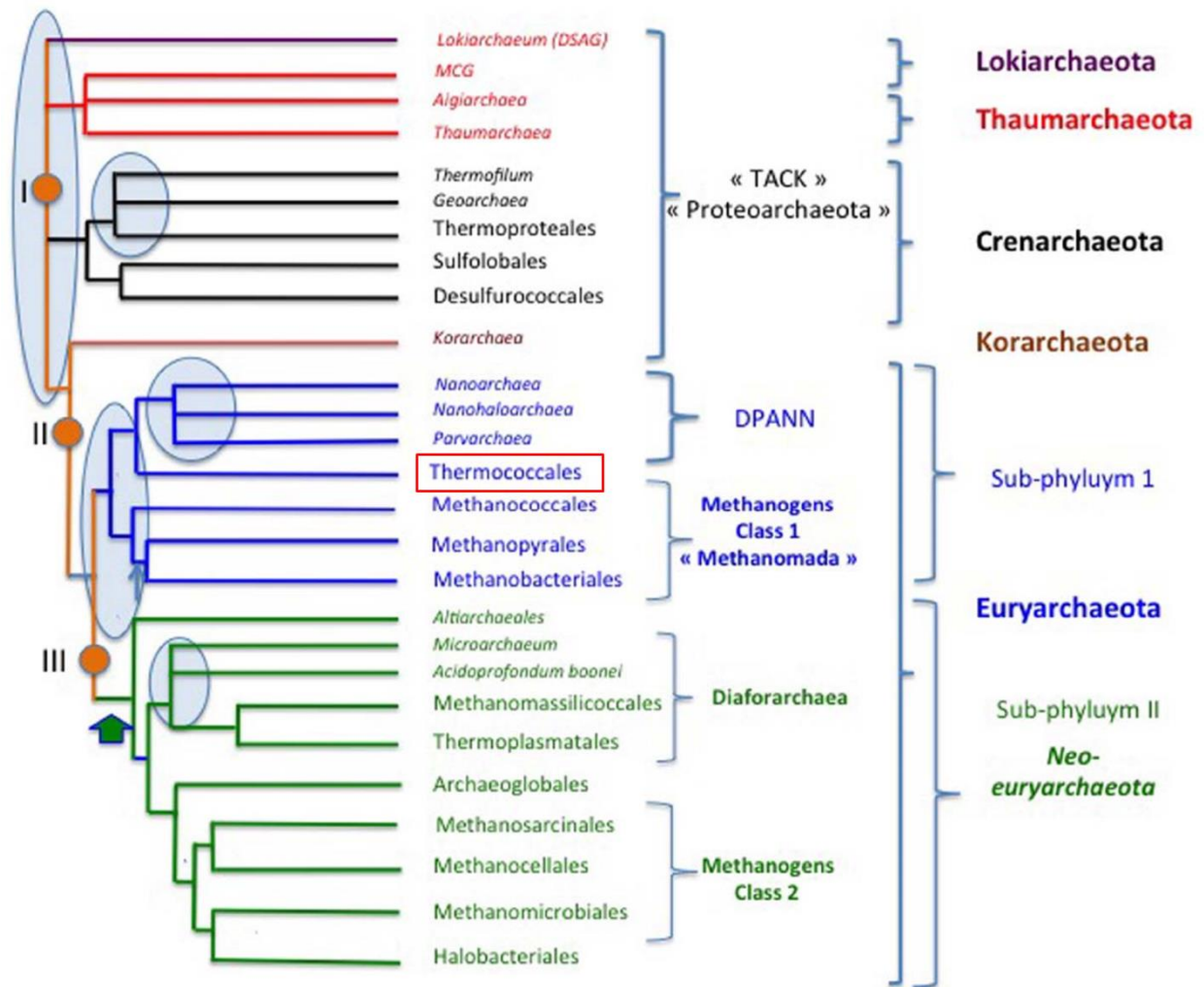
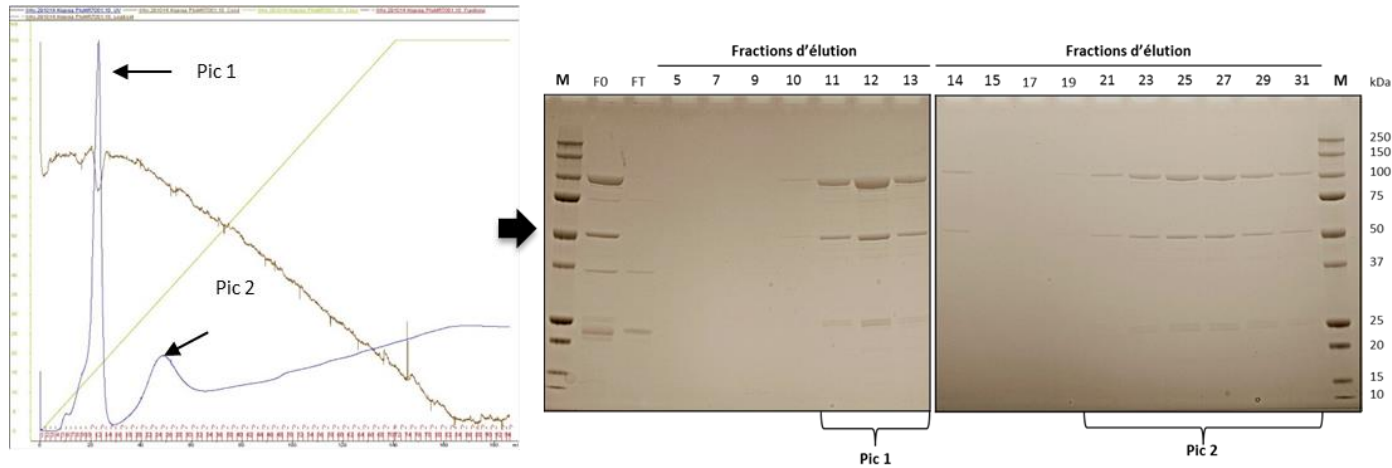


Figure 50. Classification au sein du domaine des Archaea (Forterre, 2015).

## ANNEXE 2 : PURIFICATION DES PROTÉINES

### PURIFICATION DE *PfUMRE11-RAD50*

#### 1. Chromatographie d'affinité



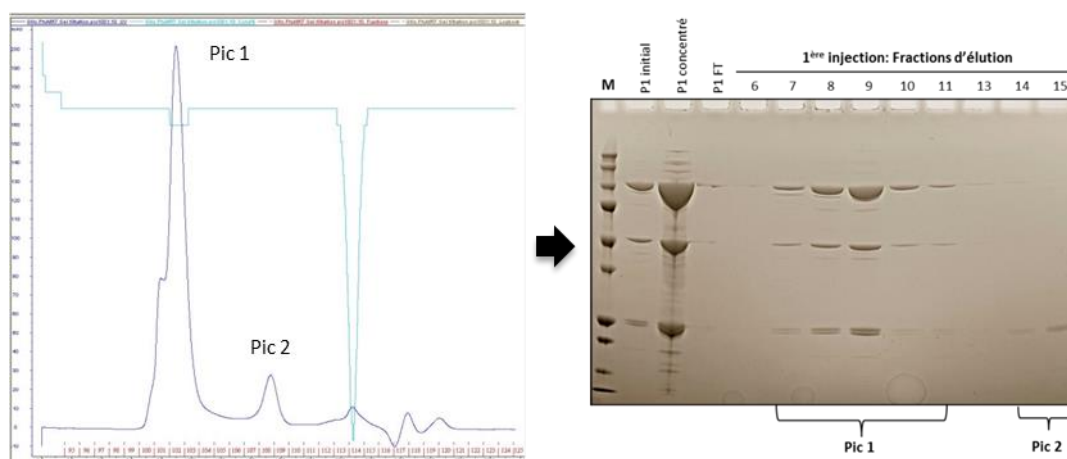
**Figure 51. Éluion de *PfuMR* après injection dans une colonne de nickel.**

Chromatogramme de l'éluion (à gauche) et profils électrophorétiques (à droite). L'éluion est réalisée dans un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM DTT et pour un gradient d'imidazole de 10 à 500 mM. La courbe bleue indique les mesures d'absorbance en sortie de colonne. Profils électrophorétique du complexe MR (49 kDa Mre11, 103 kDa Rad50). 10  $\mu$ l d'échantillon ont été déposés dans un gel dénaturant SDS-PAGE. Les fractions 11, 12 et 13 puis de 21 à 31 correspondent aux pics 1 et 2 respectivement du profil d'éluion.

#### 2. Chromatographie d'exclusion

Les fractions collectées à l'étape précédentes ont été rassemblées en deux lots numérotés #7.1 et #7.2. Chaque lot a été concentré puis injecté séparément dans une colonne de gel filtration.

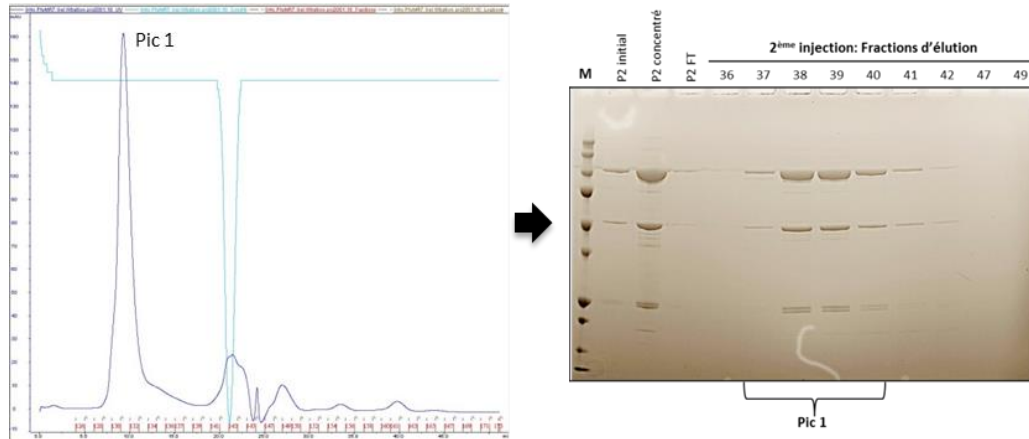
##### Injection #7.1 :



**Figure 52. Éluion de *PfuMR*#7.1 après injection dans la colonne Superdex.**

Chromatogramme de l'éluion (à gauche) et profils électrophorétiques (à droite). Les fractions 8 et 9 du pic 1 ont été mélangées pour constituer le lot final *PfuMR*#7.1a utilisé pour les expériences de SPR. Tandis que les fractions moins concentrées (7, 10, 11) ont été mises de côté sous l'appellation #7.1b.

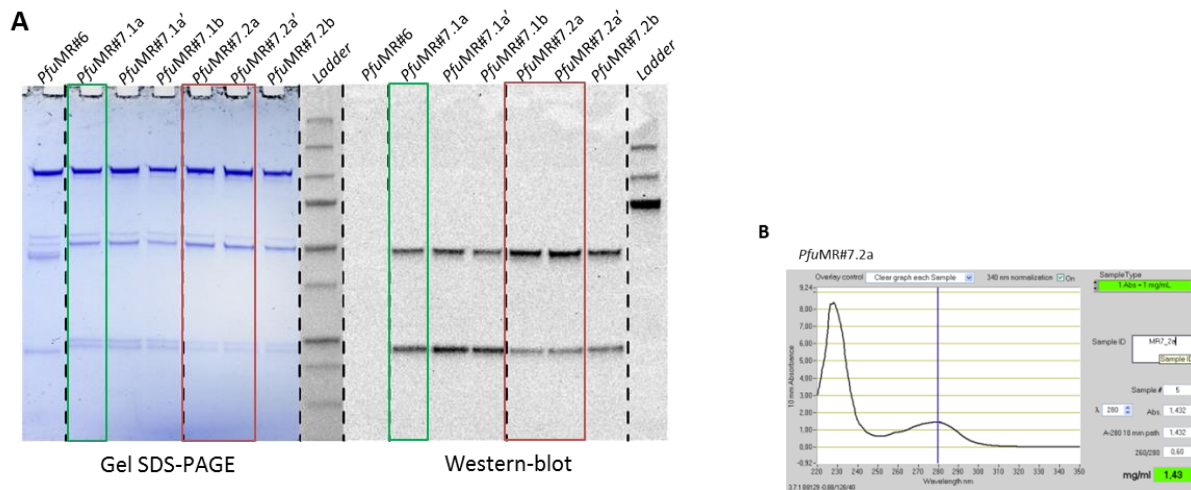
### Injection #7.2 :



**Figure 53. Éluion de *PfuMR#7.2* après injection dans la colonne Superdex.**

Chromatographe de l'éluion (à gauche) et profils électrophorétiques (à droite). Les fractions 38 et 39 du pic 1 ont été mélangées pour constituer le lot final *PfuMR#7.2a* utilisé pour les essais enzymatiques et les expériences de co-immunoprécipitation. Tandis que les fractions moins concentrées (37, 40, 41) ont été mises de côté sous l'appellation #7.2b.

### **3. Contrôle qualité des échantillons et dosage**



**Figure 54. Contrôle qualité des échantillons purifiés de *PfuMR*.**

(A) Profils électrophorétiques en gel dénaturant et révéle au bleu de comassie (à gauche) ou par Western-blot (à droite) avec un anticorps dirigé contre l'étiquette d'histidine portée par Mre11 uniquement. Chaque puit contient 1 µg de protéines. Encadré en vert, le lot ayant servi aux expériences de SPR et en rouge pour les essais enzymatiques et de co-immunoprécipitation. Les échantillons notés « ' » indiquent une conservation avec 20 % de glycérol. (B) Dosage du complexe MR par absorbance, mesure à 280 nm tout en tenant compte du ratio A260/280 qui est inférieur à 1, démontrant une présence négligeable d'ADN.





## ANNEXE 3 : SUBSTRAT ADNDB

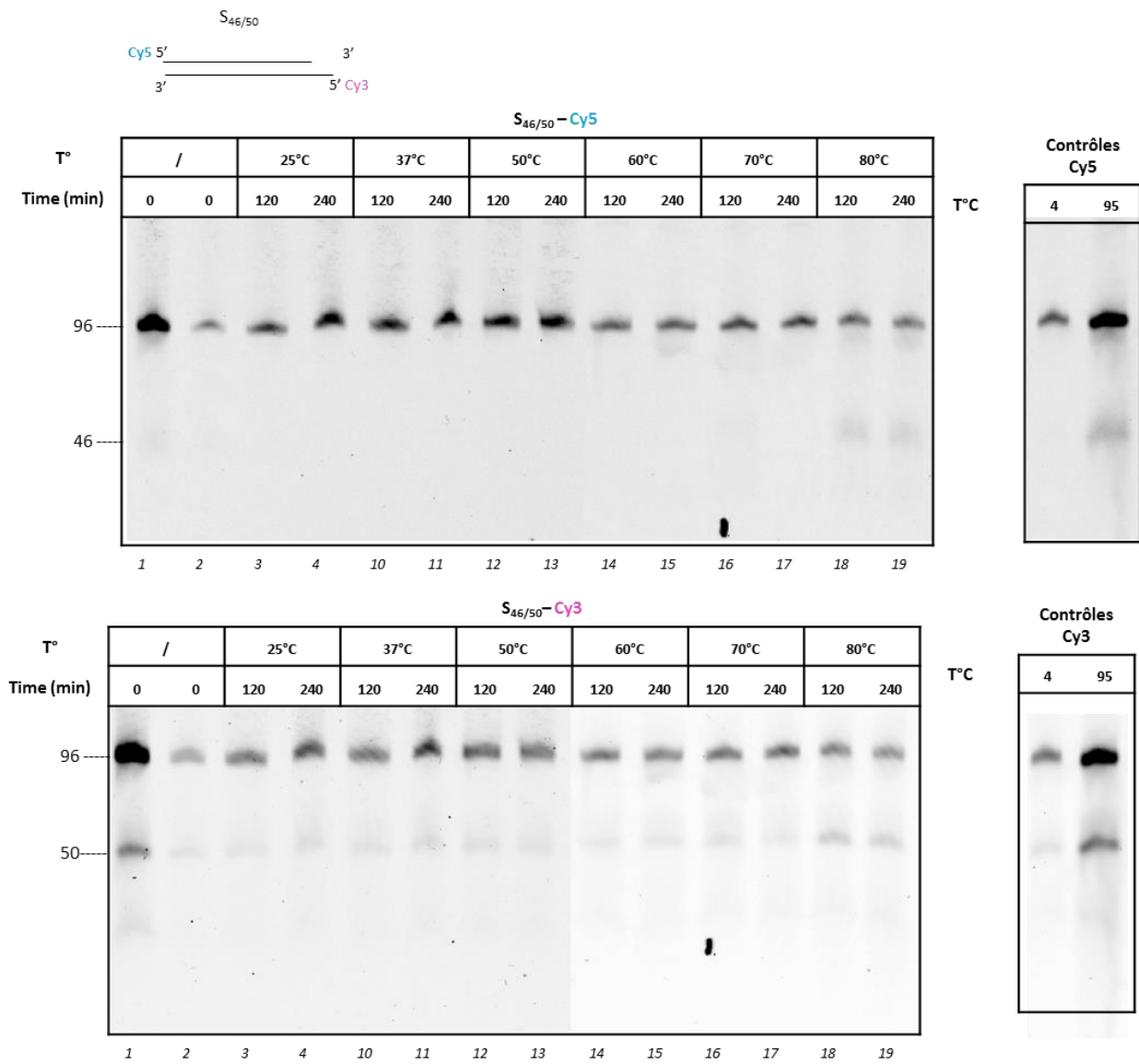


Figure 56. Pureté et stabilité du substrat ADNdb S1.

## ANNEXE 4 : PRINCIPE MÉTHODOLOGIQUE DE SPR

### Principe méthodologique de SPR

Le principe de cette technologie repose sur les propriétés optiques de la lumière lorsqu'elle illumine une interface entre deux milieux d'indices optiques différents (schéma ci-dessous). Une source de lumière polarisée va émettre un faisceau selon un angle incident particulier (au delà de l'angle critique) de sorte à produire une réflexion totale interne. À cette condition, il n'y a pas de phénomène de réfraction mais une onde évanescente (en vert) est générée et se propage perpendiculairement à l'interface des deux milieux. Lorsque l'interface en question est un métal, un phénomène de résonance peut avoir lieu. Lorsque la surface d'un métal est en contact avec un milieu diélectrique, un nuage d'électrons appelé plasmon de surface (en bleu) oscille à l'interface des deux milieux. La fréquence d'oscillation de ce plasmon dépend de l'indice optique local du milieu, et donc de la quantité de matière présente à la surface (sur une profondeur d'environ 100 nm dépendant de la longueur d'onde utilisée). C'est le couplage des deux ondes (verte et bleue) quand l'angle du rayon incident le permet, qui génère un phénomène de résonance appelé résonance plasmonique de surface. Une conséquence énergétique de cette résonance est une diminution de l'intensité du rayon réfléchi, dont l'angle d'intensité minimum est appelé angle de résonance. Cet angle va donc dépendre de l'indice optique de la solution qui va changer suivant la quantité de matière présente à au voisinage de la surface. Cette variation de l'angle de résonance est lue par le détecteur et traduit en signal. C'est cette variation de signal qui va nous intéresser pour suivre la réaction de complexation entre deux partenaires dont l'un sera la sonde et l'autre l'analyte.

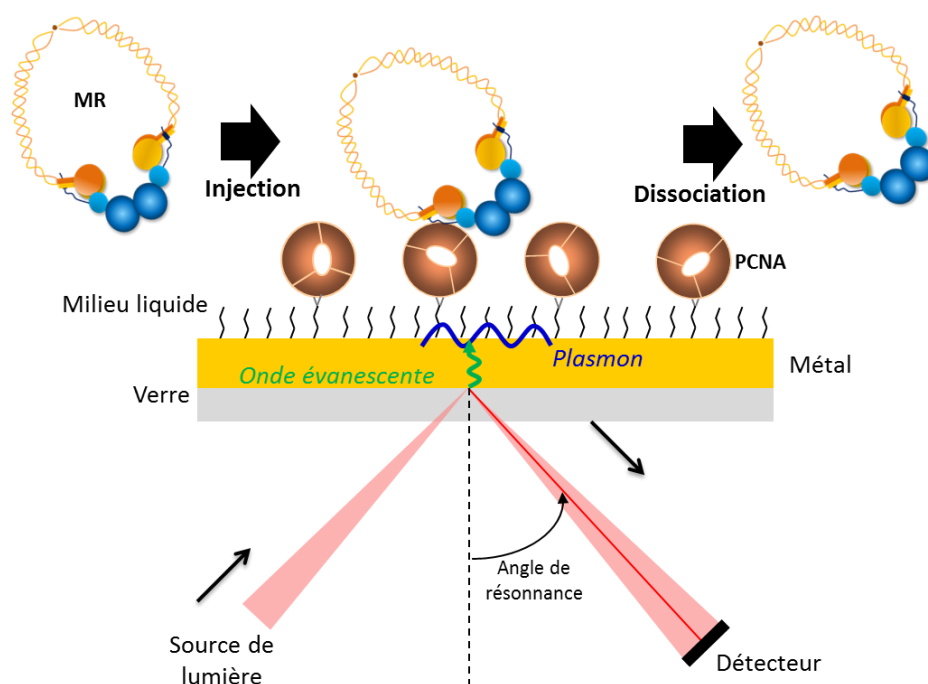


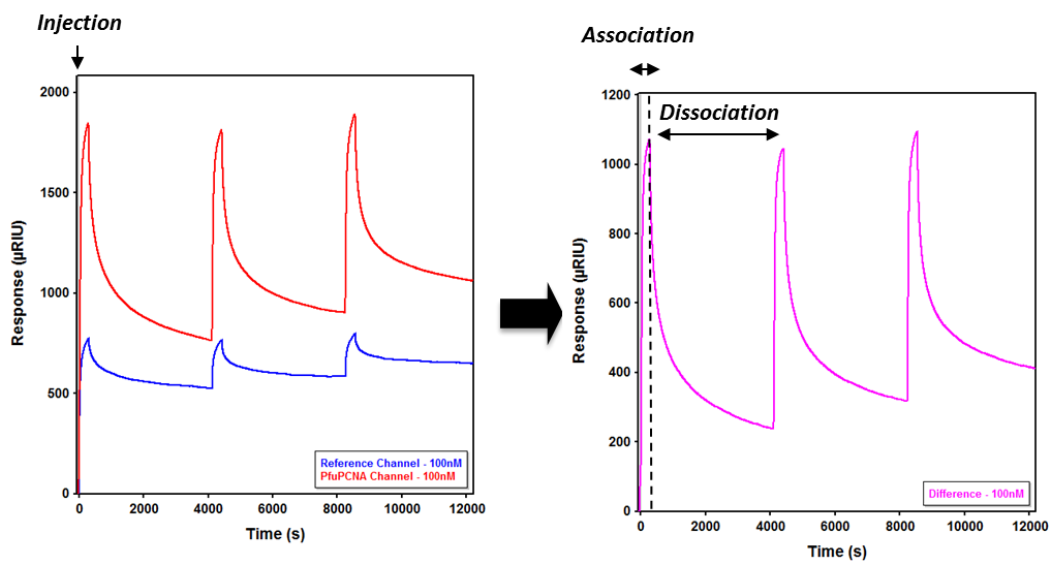
Figure 57. Représentation schématique du phénomène de résonance plasmonique de surface.

### ***Immobilisation de la sonde***

Avant d'observer une quelconque interaction, il nous faut d'abord immobiliser l'un des deux partenaires qui va servir de sonde (dans notre cas *Pfu*PCNA) sur un support commercial pré-fonctionnalisé. Ce support se présente sous la forme d'une lamelle en verre revêtue sur une face d'une fine couche d'or en guise d'interface métallique. La face en verre est optiquement couplée à la surface d'un prisme en verre de haut indice (en saphir sur notre appareillage). La face dorée sur laquelle aura lieu l'interaction, est recouverte par une monocouche d'alcane oligoéthylène glycol (OEG) limitant les interactions non spécifiques à la surface même du métal. Certains de ces alcanes possèdent une extrémité – COOH qui lorsqu'elle est activée par des agents chimiques permet d'ancrer covalamment la sonde *via* un couplage des amines. Cette immobilisation est nécessaire dans la mesure où les acquisitions sont réalisées avec un débit continu de tampon pouvant contenir l'analyte (*Pfu*MR ou un peptide). Contrairement aux expériences de co-immunoprécipitation, ici l'objectif est de suivre en temps réel la réaction de complexation entre les partenaires pour en déterminer les constantes cinétiques qui la caractérise.

### ***Appareillage***

L'instrumentation utilisée ici est un réfractomètre SPR Reichert SR7000DC disposant de deux canaux : un canal 1 dit de « référence » et le canal 2 dit de « mesure ». L'appareil est couplé à un injecteur automatique Reichert SR7100 qui permet d'injecter l'analyte par un circuit microfluidique au niveau du support ; cet analyte dilué dans un tampon circule à flux constant dans une cellule en forme de « U ». Sur son parcours l'analyte va passer dans un premier temps dans la région de la surface présentant uniquement la couche d'alcane OEG (canal 1) puis au niveau de la partie où *Pfu*PCNA a été immobilisé (canal 2). Si l'analyte est retenu, cela va induire un changement de masse à la surface du support provoquant une modification de l'angle de résonance. Réciproquement cette variation du signal est proportionnelle à la quantité de matière retenue sur la surface. C'est la différence entre les deux canaux qui est traitée pour éliminer la variabilité du signal qui ne serait pas liée à une interaction spécifique des molécules (Figure 58).



**Figure 58. Sensorgrammes pour une série de trois injections successives.**

À gauche, signaux des canaux 1 (de référence en bleu) et 2 (en rouge où la sonde est immobilisée). À droite, signal différentiel des deux canaux. Lors de la phase d'injection de l'analyte, l'augmentation du signal traduit une accumulation de matière à la surface du biocapteur et donc une association de l'analyte sur la sonde. En fin d'injection, la circulation d'un tampon de course entraîne la dissociation du complexe et donc un retour du signal vers la ligne de base (position initiale avant injection).

## ANNEXE 5 : PROCÉDURE DE MODÉLISATION DE L'INTERACTION PCNA/MR À PARTIR DES DONNÉES SPR.

### *Modélisation : un pas en avant, deux pas en arrière*

Pour tenter d'interpréter ces différentes données et ainsi obtenir l'affinité du complexe MR pour PCNA, une approche de modélisation a été menée. La modélisation va consister à décortiquer les mécanismes d'association et de dissociation des partenaires en leur attribuant des réactions élémentaires expliquant au mieux les courbes expérimentales. Pour cette modélisation, nous avons exploité la version tronquée PfuMR<sup>link1</sup> que nous avons encore en quantité suffisante et dont nous disposons des données produites par notre collaborateur G. Williams. La forme des courbes obtenues indique une réaction de fixation complexe. Il y aurait vraisemblablement un enchaînement de réactions ou plusieurs réactions en parallèle ayant différentes constantes de dissociation. Il nous fallait donc trouver un système complexe à  $n$  réactions ( $n > 1$ ) reliées de façon adéquate et ayant une réalité biochimique.

### *Un modèle impliquant trois formes de MR.*

De façon intéressante, le modèle se rapprochant au plus près des données expérimentales implique la présence d'au moins trois formes hétérogènes du complexe MR ayant chacune des propriétés de dissociation différentes. C'est justement trois formes de MR qui ont été répertoriées en solution par G. Williams avec une construction équivalente à PfuMR<sup>link1</sup> (Williams et al, 2011). En combinant des analyses structurales par SAXS avec des méthodes de modélisation de la dynamique des protéines, ils ont identifié : (i) en absence d'ATP, une forme majoritaire partiellement ouverte (63%) en mélange avec des formes ouverte (10%) et fermée (27%) de MR et (ii) en présence d'ATP/Mg<sup>2+</sup>, 89% de complexe fermé ou ATP-lié contre 11% de forme partiellement ouverte. Selon ces données publiées, nous avons construit un modèle décrit dans le tableau ci-dessous, avec des constantes d'association ( $k_{on}$ ) et de dissociation ( $k_{off}$ ) propres à chaque conformation du complexe MR (ouverte, ouverte/fermée, fermée ou ATP-lié).

**Tableau 11. Réactions à modéliser pour analyser la complexation PCNA/MR.**

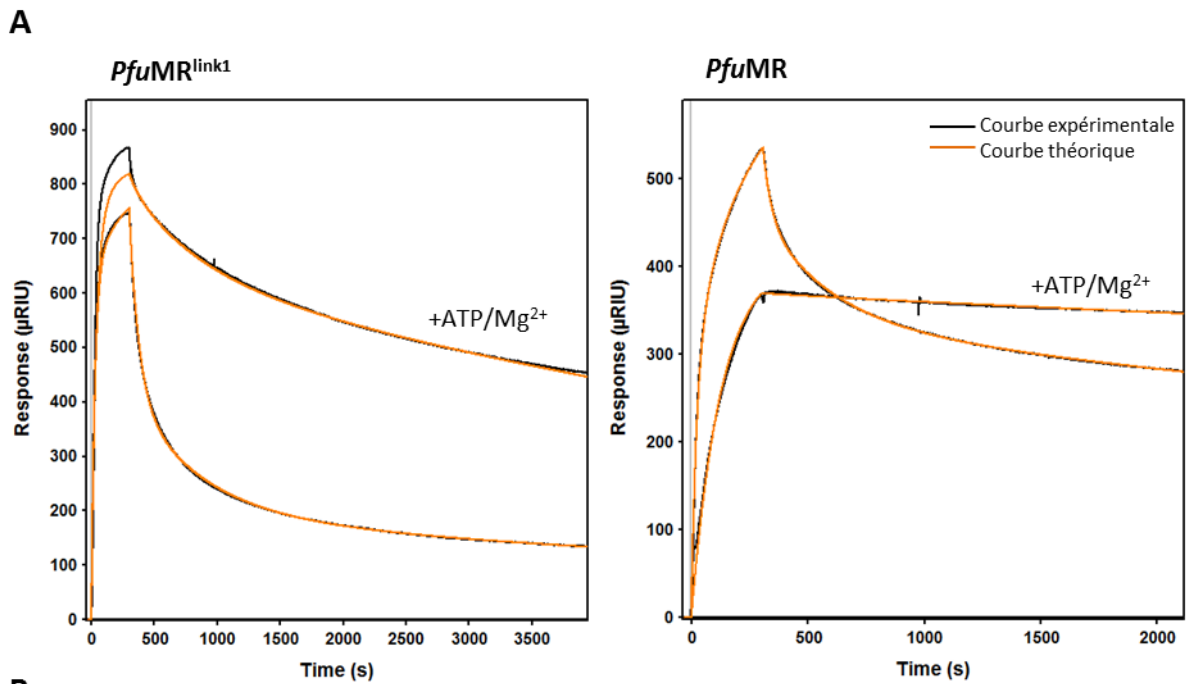
Ces réactions tiennent compte d'un équilibre en solution entre trois conformations du complexe MR (schéma de droite) et que chacune de ces formes interagit avec PCNA selon des constantes potentiellement différentes.

Réactions		Constantes
<b>Equilibre conformationnel</b>	$\text{MR}_{\text{ouvert}} \rightleftharpoons \text{MR}_{\text{ouvert-fermé}}$	$k_{\text{on}'}/k_{\text{off}'}$
	$\text{MR}_{\text{ouvert-fermé}} \rightleftharpoons \text{MR}_{\text{fermé}}$	$k_{\text{on}''}/k_{\text{off}''}$
<b>Complexation</b>	$\text{PCNA} + \text{MR}_{\text{ouvert}} \rightleftharpoons \text{PCNA/MR}_{\text{ouvert}}$	$k_{\text{on}1}/k_{\text{off}1}$
	$\text{PCNA} + \text{MR}_{\text{ouvert-fermé}} \rightleftharpoons \text{PCNA/MR}_{\text{ouvert-fermé}}$	$k_{\text{on}2}/k_{\text{off}2}$
	$\text{PCNA} + \text{MR}_{\text{fermé}} \rightleftharpoons \text{PCNA/MR}_{\text{fermé}}$	$k_{\text{on}3}/k_{\text{off}3}$

$k_{\text{on/off}'}$  et  $k_{\text{on/off}''}$  ( $\text{s}^{-1}$ ): constantes microscopiques menant de l'espèce A à l'espèce B (*on*) et inversement (*off*).  
 $k_{\text{on}}$  ( $\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ): constante microscopique d'association  
 $k_{\text{off}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ): constante microscopique de dissociation  
 $K_D$  (M): constante d'équilibre de dissociation aussi dite d'affinité

L'application de ce modèle aux données obtenues produit des courbes théoriques se superposant aux données expérimentales (Figure 59.A). L'ensemble des données pourrait donc s'expliquer par un changement de population du complexe  $PfuMR^{\text{link}1}$  provoqué par l'ajout d'ATP/Mg<sup>2+</sup>. D'autre part, nous avons pu ainsi proposer des valeurs pour les constantes cinétiques de cette interaction (Tableau Fig4, l'ensemble des constantes utilisées pour la modélisation sont précisées en annexe.) À partir de ces constantes  $k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$  il est possible de calculer les pourcentages de chacune des formes de MR (Figure 59.B). Ces pourcentages coïncident avec ce qui était décrit par G. Williams pour les trois conformations du complexe  $PfuMR^{\text{link}1}$ . Pour le complexe  $PfuMR$ , la forme ATP-lié serait largement majoritaire, à 98 % présente en solution avec l'ATP/Mg<sup>2+</sup> et présenterait une plus grande stabilité avec  $PfuPCNA$  étant donné sa faible constante de dissociation  $k_{\text{off}}(PfuMR \text{ ATP/Mg}^{2+}) = 3,40\text{E-}05 \text{ s}^{-1}$ .

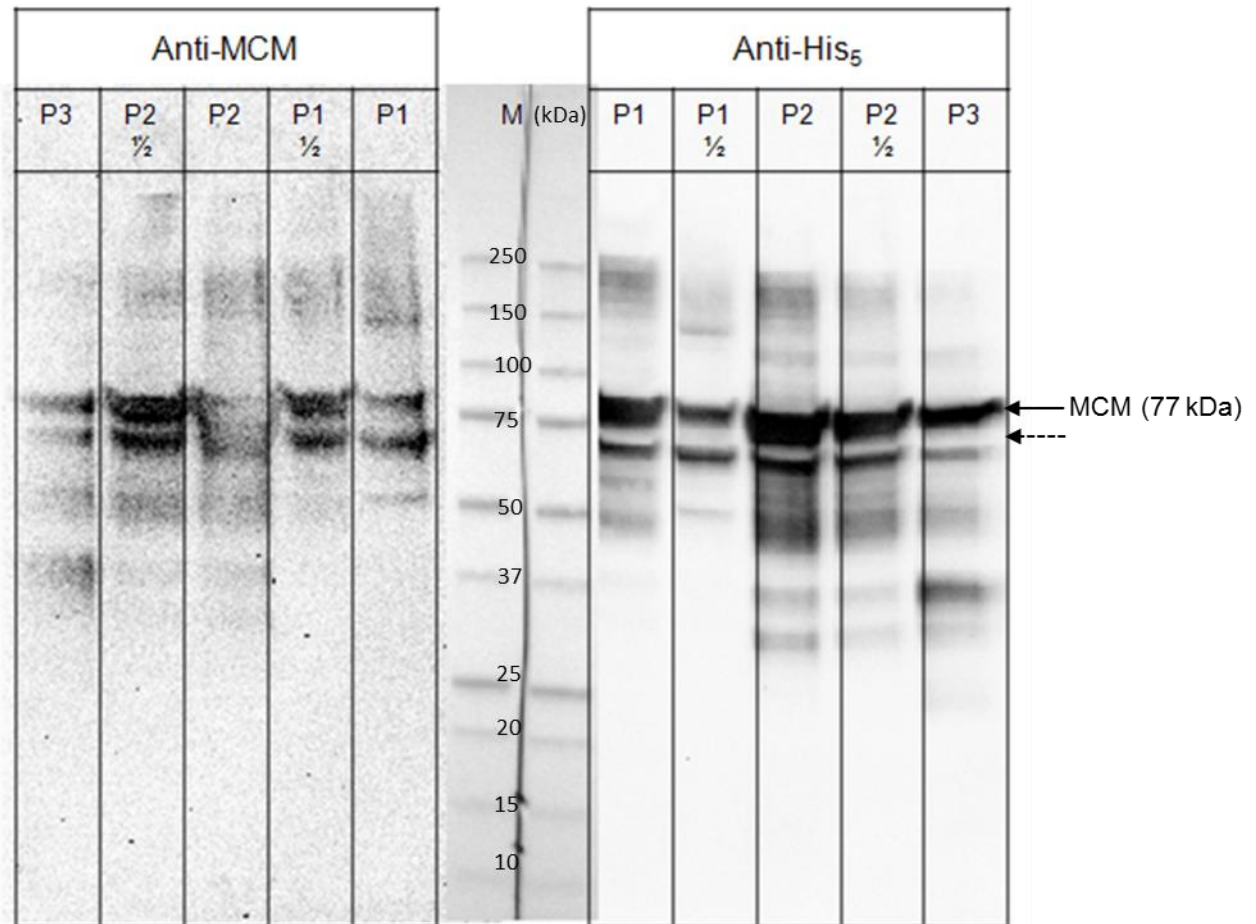


**Figure 59. Modélisation de l'association des complexes *PfuMR*<sup>link1</sup> et *PfuMR* à *PfuPCNA*.**

(A) Les courbes modélisées (en orange) se superposent parfaitement pour la phase de dissociation avec les courbes expérimentales (en noir). Les acquisitions ont été réalisées à 25°C après injection de 100 nM de complexe MR contenant lorsque précisé 5 mM ATP/Mg<sup>2+</sup>. (B) Trois formes du complexe MR interagissent avec PCNA selon des constantes de dissociation ( $k_{off}$ ) distinctes. Les pourcentages fournis dans ce tableau représentent le pourcentage estimé pour chaque conformation du complexe MR en solution suivant la présence du couple ATP/Mg<sup>2+</sup>.

## ANNEXE 6 : PURIFICATION DES HÉLICASES

### Analyse Western-blot de *PabMCM*.



**Figure 60.** Analyse d'immunodétection de *PabMCM* dans les fractions collectées après gel filtration.

Deux anticorps ont été utilisés, l'un dirigé contre la protéine MCM de *P. abyssii* (gel de gauche) et l'autre contre le His-tag (gel de droite). Tous deux révèlent bien la présence de *PabMCM* à 77 kDa mais aussi que la forme secondaire de poids moléculaire inférieur correspond à la protéine *PabMCM* ayant le His-tag en N-ter.



## ANNEXE 7 : SÉQUENCES MCM/XPD

### Sequence nucléotidique MCM sans inteines - 2037 bp

N-terminal

**ATGGATAGAGAGGAGATCATCGAGAGATTCTGAGATTCTTAGGGAGTACGCTGAGGAGGGTGA**  
GGAGCCCCTATATATAGGTAATAAAGGATTTGCTCGCTATAACTCCTAAGAGATCAATAGCGAT  
AAACTGGATGCATCTCAACTCTTTTCGACCCCGAATTAGCAGAAGAAGTGCTTGAGAATCCAGAGG  
AGTGCATACTAGCGGCCGAAGATGCAATACAGATAATCTTAAAGGAGGATATAATGAGGGAAAGAC  
GTCCCAGGATTCACGCTAGGTTCTACAACCTCCCAAAAACACTTATGGTCAAGGAAATCGGGGCG  
GAACACATAAATAAGCTAATCCAAGTCGAGGGGGTAGTAACAAGAGTTACCGAGATAAAACCGTT  
CGTCTCTTCAGCCGTCTTCGTATGTAAGGATTGCGGACATGAGATGGTGGTTACAGCAGAAGCCCTA  
CGAGGGGTTCTGGCTGTTAAGAAGTGTGAGAAATGCGGAAGCAAGAACGTCCAGCTCGATGTAG  
AGAAGAGCAAGTTCGTGAACTTCAGATGTTTCAGGATTCAGACAGGCCCGAAACGCTGAAGGGT  
GGCAAATGCCGAGGTTTCATAGACGGGATACTGCTAGATGACATCGTGGACACGGCTATGCCGGG  
AGACAGGGTTGTGGTTGTAGGCATCCTCAGGGTAGTCCAGGAGAAGAGGGGAGAAAGTCCCAACGT  
TCAAGAAGGTAATAGAGGTTAATTACATTGAGCCCGTAAGCAAGGAGATTGAGGAACTTGAGATA  
ACGCCAGAGGAAGAGCAGAAAATTAGGGAGCTCGCCAAGAGGAAGGACATAGTTGACGCGATCG  
TTGATTCAATAGCACCGGCGATTTACGGTTACAGGGAGGTTAAGAAGGGAATAGCGTTAGCACTAT  
TCGGGGAGTCCCCAGGACTTTACCGGATGGAACGAGGTTAAGAGGAGATATTCACGTTCTCCTGG  
TAGGAGATCCGGGAGTCGCAAAAAGCCAACCTTCTCAGATACATAGCAAATTTAGCCCCAAGGGCA  
ATATACACTTCAGGGAAGAGCAGTTCTGCCGCTGGGCTCGCCGCGGTGGTTAGGGACGAGTTACG  
GGAGGCTGGGTTCTAGAGGCTGGAGCCCTAGTTTTGGCCGATGGGGGTTACGCGCTAATAGATGAG  
CTTGATAAGATGAACGACAAGGATAGGAGCGTAATTCACGAAGCATTGGAGCAGCAAACGATAAG  
TCTATCAAAGGCAGGGATAACGGCAACCCTAAATGCTAGAACAACCGTCATAGCAGCAGCAAATC  
CAAAGCAGGGAAGGTTCAATAGGATGAAAAGGATATCGGAACAGATAAACTTGCCCCAACTTTG  
ATGAGCAGATTCGACCTCATTTCGTCCTAGTAGATGAACCTGACGAAAAGATAGACAGCGAGATA  
GCTAGGCACATCCTGAGGGTTCAGGAGGGGAGAAAGCGAGGTAGTAACCTCCAAGATACCTCACGA  
CCTCTTGAGGAAGTACATAGCGTACGCCAGGAAAACGTTTCATCCAGTAATAAGCGAGGAGGCAA  
TGGAGGAGATAGAGAAGTACTACGTGAAGATGAGGAAGAGTGTAAAGAAGAGTAGCGAGGAAGA  
GATAAAGCCAATTCCAATAACCGCGAGGCAGTTGGAGGCCCTCATAAGGCTGAGCGAGGCTCATG  
CTAGGATGAGGTTAAGCCCAGATAGTCACTAGAGAGGATGCCAGGGAAGCTATAAAGCTGATGGAA  
TATACCTTAAGGCAGATAGCCGTGGATGAAACTGGTCAAATCGACGTTACAATCTTGGAGGTTGGC  
CAGAGCGGAGGAAGCTCAGCAAGGTTGAGAGGATACTCGACATAATAGAGAAGCTAGAGGGGA  
CCAGCGAGAAAGGGGCTAAAATCGATGATATCTTAGAAGAGGGCGAAGAAGTTTGAATAGAGAAG  
CAAGAAGCTAGAGAAATACTAGAAAAGTTGTTAGAGCAGGGTCAAATATACATGCCGGAGAACGG  
TTATTACAGAACCGTC - C-terminal

PabXPD

Clonage pET25b+ BamHI/NdeI

GGATCCATGTTTGAATACTTCCCGTATAAGACGCTTAGACCTCACCAAGATGAATTTATAGAGTTA  
GTCAGGGATGTTGTTAAAAGGGGAGAGAAGGTTATAATTGAGGCTCCAAGTGGTTTTGGAAAGACT  
ATAAGTGTTTTGGCTGGAGTTCCTCCGCACGCGATATCCTTCGGATACAAGGTGATTTACCTAGCTA  
GAACTACAAGCAGATGGATAGGGTTATAGAGGAGCTCAAGAGGATAAGAGAAATTGCGAAGGTA  
AGTGGCATTGAATTCAGAAGCAGGAAAGATCTCTGCCCTCCACTCCTACATAAGGACGTTTCGCCAA  
GATGCTTATACTAGTATGATAGTCTGCAAAAGCTTGAAGAGGCTTGGAAAGTGCAAGTACTTTGAG  
AATTTGAAAGAAAAGAGGGGATAAAGTAAAGAGATCGTTGAATTCTTCTTGAGAATCCATCCTAT  
CCTTGGGAGGTCATAGAGTACTCGAACTTGCTTGGAGCTTTGTCCTTACGAGGTAACGAGGAAGGTT  
GGAGAGAAGGCCAACGTTATAGTGGCGAGCTACCTTACATGGTGAACCCTTGGATAAGGCAGGC  
CTTCTTGATGGGCTCGGCTTGAATATAGTGACCTCATAGTTATCTTCGACGAAGCTCACAACTT  
CCGGATCAGGCTATATCAGCTTTGAGCGATAGGTTAAGCATTAGGAGCGTTGAGAGGGCAATTA  
GAGGCTAACGAATATGGCGAGAAGGATATTGAAAATTTCTTTCAATATTTCTAAGAGGATTGGAA  
ATAATCTACAAAGAAAAGCTTGAAGACTACGAGATTTCCGAAAGTCCCTATCTCCAGCTTCATA  
TTTGAGCACGTCTCCTCAATACTCGGGCTCAGGGAGAGAGACCTACTTAGATTTCTCAAGAGATG  
GTCGAGGTTGGGGATGCCATTAGGGAGGACAAAATTGAGAGGAACCTCCCACCGAGGAGCTACGT  
AGGTAGGGTCGGTGAGTTCTTTGAACTGGATCTCCTTAGCTGATAGAAGCGATTACCTTCACGT  
GTTACGAGGGAGAAAGGACTAGCGCTCGAGATAGTGGCCTTAGATCCTTCTGTAGCGCTCGAGTT  
TCTTGAAGATGTTCACTCGGCCATACTAATGTCCGGAACGTTATCTCCTCTCGAGGCCTTTAGGGAT  
ATAATAGGGGTAAACGCCAGACTCAAGAAGTTCCCTAGGATGGTAAAATCGGAGAACGCAATAGT

TCTCGTCGCTAGAGATGTCTCCACTAGGGGGGAAGAGCGGAGCCCAGTCCTTTACAAGAAGTTAGC  
AGAATACATTTTTGAGGCGGTTAAGATAATTCCGAAGAACGTTGGTGTCTTTACCGCATCTTACGA  
GGTTTTAGAAGGACTAATATCGACCAATGTGCATATAAGGATAGAAGAAGAGATCGGAAAGAAGG  
TTTTCATAGAGAAGAGGGATGCAAGTTCCTCGGAGAATGATGCCCTTGTAGCCGAATTC AAGGCTG  
AAGCAAAGGGAAACGGCGGAGTTCTCTTTGGTGTATGGGAGGTAGAAACAGCGAGGGTCAAGAT  
TATAGTGGAGATGAAATGAATGGTGAATCTTGGTTCGGAATACCTTACGCTAGGCCACACCGAGG  
GTTCAAGCTCAGATAAAGTACTACGAGAAGAAGTCCAGGGAAGGGAAGGTATTACGGTACTT  
ACTTCCAGCTCATAGAAAGCTAGCCCAAGCCGCTGGAAGGGTTCACAGGAGCGAGGAAGAAAAGG  
GAAGCATAGTAATCTTAGACTATAGGGTTCTCTGGAATACCGTTAAAAGGGATCTCCCCGATTGGA  
TGGTTGAAACAATGCAACCTGTGACGTTGCCCTTAATGAGGATTAACCTTAGGAAGTTCTGGAGGG  
CCGTGAAATGAGTTCGAC

Clonage pET28a+ BamHI/NdeI

CCATGGATGTTTGAATACTTCCCCTATAAGACGCTTAGACCTCACCAAGATGAATTTATAGAGTTA  
GTCAGGGATGTTGTTAAAAGGGGAGAGAAGGTTATAATTGAGGCTCCAACCTGGTTTTGGAAAGACT  
ATAAGTGTTTTTGGCTGGAGTTCTTCCGCACGCGATATCCTTCGGATACAAGGTGATTTACCTAGCTA  
GAACTCACAAGCAGATGGATAGGGTTATAGAGGATAAGAGAAATTCGGAAGGTA  
AGTGGCATTGAATTCAGAAGCAGGAAGATCTCTGCCTCCACTCTACATAAGGACGTTCCGCCAA  
GATGCTTATACTAGTATGATAGTCTGCAAAGCTTGAAGAGGCTTGGAAAGTGAAGTACTTTGAG  
AATTTGAAAGAAAAGAGGGATAAAGTTAAAGAGATCGTTGAATTTCTTCTTGAGAATCCATCCTAT  
CCTTGGGAGGTCATAGAGTACTCGAAGTTGCTTGGAGCTTTGTCCTTACGAGGTAACGAGGAAGGTT  
GGAGAGAAGGCCAACGTTATAGTGGCGAGCTACCTTTACATGGTGAACCCTTGGATAAGGCAGGC  
CTTCTTGGATGGGCTCGGCTTGGAAATATAGTGACCTCATAGTTATCTTCGACGAAGCTCACAACCTT  
CCGGATCAGGCTATATCAGCTTTGAGCGATAGGTTAAGCATTAGGAGCGTTGAGAGGGCAATTAAA  
GAGGCTAACGAATATGGCGAGAAGGATATTGAAAATTTCTTTCAATATTTCTAAGAGGATTGGAA  
ATAATCTACAAAGAAAAGCTTGAGAACTACGAGATTTCCGAAAGTCCCCTATCTCCAGCTTCATA  
TTTGAGCACGTCTCCTCAATACTCGGGCTCAGGGAGAGAGACCTACTTAGATTTCTCCAAGAGATG  
GTCGAGGTTGGGGATGCCATTAGGGAGGACAAAATTGAGAGGAACCTCCCACCGAGGAGCTACGT  
AGGTAGGGTTCGGTGTGAGTTCTTTGGAAGTGGATCTCCTTAGCTGATAGAAGCGATTACCTTCACGT  
GTTACGAGGGAGAAAGGACTAGCGCTCGAGATAGTGGCCTTAGATCCTTCTGTAGCGCTCGAGTT  
TCTTGAAGATGTTCACTCGGCCATACTAATGTCCGGAACGTTATCTCCTCTCGAGGCCTTTAGGGAT  
ATAATAGGGGTAAACGCCAGACTCAAGAAGTTCCTTAGGATGGTAAAATCGGAGAACGCAATAGT  
TCTCGTCGCTAGAGATGTCTCCACTAGGGGGGAAGAGCGGAGCCCAGTCCTTTACAAGAAGTTAGC  
AGAATACATTTTTGAGGCGGTTAAGATAATTCCGAAGAACGTTGGTGTCTTTACCGCATCTTACGA  
GGTTTTAGAAGGACTAATATCGACCAATGTGCATATAAGGATAGAAGAAGAGATCGGAAAGAAGG  
TTTTCATAGAGAAGAGGGATGCAAGTTCCTCGGAGAATGATGCCCTTGTAGCCGAATTC AAGGCTG  
AAGCAAAGGGAAACGGCGGAGTTCTCTTTGGTGTATGGGAGGTAGAAACAGCGAGGGTCAAGAT  
TATAGTGGAGATGAAATGAATGGTGAATCTTGGTTCGGAATACCTTACGCTAGGCCACACCGAGG  
GTTCAAGCTCAGATAAAGTACTACGAGAAGAAGTCCAGGGAAGGGAAGGTATTACGGTACTT  
ACTTCCAGCTCATAGAAAGCTAGCCCAAGCCGCTGGAAGGGTTCACAGGAGCGAGGAAGAAAAGG  
GAAGCATAGTAATCTTAGACTATAGGGTTCTCTGGAATACCGTTAAAAGGGATCTCCCCGATTGGA  
TGGTTGAAACAATGCAACCTGTGACGTTGCCCTTAATGAGGATTAACCTTAGGAAGTTCTGGAGGG  
CCGTGAAATGAGGATCC



## RÉSUMÉ

Vivant à des températures supérieures à 80°C, les archées hyperthermophiles ont démontré une capacité étonnante à se remettre de dommages dans leur ADN, suggérant la présence de gardiens du génome particulièrement efficaces. Ces gardiens, des protéines relativement similaires entre archées et eucaryotes, agissent et interagissent dans un ballet savamment orchestré par la cellule. Pourtant plusieurs protéines impliquées dans des voies essentielles à la réparation de l'ADN manquent à l'appel chez les archées. Pour avancer dans la connaissance sur ces mécanismes de la maintenance génomique chez les archées, un réseau d'interactions protéine-protéine a été révélé précédemment au laboratoire à partir des protéines de *Pyrococcus abyssi*. Ces travaux ont dévoilé de nouvelles interactions où interviennent protéines de la réplication et protéines de la réparation de l'ADN. Décrire l'interaction pour mieux comprendre sa fonction, voici la démarche suivie et présentée dans ce manuscrit pour les duos : PCNA/Mre11-Rad50 et MCM/XPD. Pour la première fois chez *Pyrococcus furiosus*, une interaction physique et fonctionnelle a été démontrée entre PCNA, le *maestro* de la réplication, et Mre11-Rad50, le complexe de la recombinaison. À travers cette étude un motif d'interaction au PCNA dérivé du PIP-motif a été identifié dans la séquence de Mre11 qui a également été révélé dans toutes les séquences Mre11 connues chez les Thermococcales, soulevant diverses interrogations quant à sa présence parmi des archées hyperthermophiles. Pour la seconde étude, la caractérisation de l'hélicase répllicative MCM de *P. abyssi* a été menée *via* une approche biophysique basée sur des techniques de fluorescence. Les difficultés rencontrées durant la production de son partenaire potentiel XPD, n'ont toutefois pu permettre la caractérisation de leur interaction. Plus généralement ces interactions s'inscrivent dans un contexte où le couplage de la réplication avec des processus de réparation trouve son importance particulièrement chez les archées de l'extrême, archées qui se révèlent être de passionnants modèles pour l'étude des mécanismes de la maintenance génomique.

Mots clefs : Archée, Réplication et Recombinaison de l'ADN, Interaction protéine-protéine.

---

## ABSTRACT

Living at temperatures above 80°C, hyperthermophilic *Archaea* demonstrated amazing capacity to recover from DNA damages, suggesting they arguably have efficient genome guardians. These guardians, proteins which are relatively similar between *Archaea* and eukaryotes, act and interact like a ballet orchestrated by the cell. Several proteins involved in essential repair pathway in eukaryotes are missing in *Archaea*. To gain insights into archaeal genome maintenance processes, a previous work proposed a protein-protein interaction network based on *Pyrococcus abyssi* proteins. Through this network, new interactions involving proteins from DNA replication and proteins from DNA repair were highlighted. To describe interactions for a better understanding of their functions, was the aim of the work presented here for two protein interactions: PCNA/Mre11-Rad50 and MCM/XPD. For the first time in *Pyrococcus furiosus*, we demonstrated both physical and functional interplay between PCNA, the replication maestro, and Mre11-Rad50, a complex involved in recombination process. An interaction PCNA binding motif (PIP-like motif) was identified in Mre11 and was also revealed among all Thermococcales Mre11 sequences, raising questions about its presence in hyperthermophilic *Archaea*. For the second studied interaction, we used a biophysics approach based on fluorescent technics to characterise helicase activity of *P. abyssi* MCM. As several problems were encountered for XPD production, we did not characterise the helicase interaction. These two interactions are part of a more general context, where combined DNA replication and DNA repair processes could be important, especially for extremophile *Archaea*, *Archaea* which are amazing study models for understanding molecular processes ensuring genome integrity.

Key words: *Archaea*, DNA replication, DNA repair & recombination, protein-protein interaction.