UMR8200
Genetic Stability & Oncogenesis

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Unité : UMR 8200 Stabilité Génétique & Oncogenèse

Equipe : Plasticité du génome et cellule B

Rôle du complexe de cohésion sur la ligature d'extrémités d'ADN non homologues et la stabilité du génome

The cohesin complex protects against genome rearrangements by preventing the end-joining of distal DNA double-strand-ends

Par Camille Gelot

Thèse pour obtenir le grade de :

Docteur de l'Université Paris VI, UPMC

Présentée et soutenue publiquement le 10 septembre 2014

Devant un jury composé de :

Pr Emmanuèle MOUCHEL-VIELH	Présidente
Dr Gaëlle LEGUBE	Rapporteur
Dr Ludovic DERIANO	Rapporteur
Dr Patrick REVY	Examinateur
Dr Bernard LOPEZ	Examinateur
Dr Said AOUFOUCHI	Directeur de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie également la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), le CNRS et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour avoir financé ces quatres années de thèse. Mes remerciements s'adressent également à l'Uninersité Paris 6 (UPMC) au sein de laquelle j'ai effectué toute ma formation scientifique et ma première expérience d'enseignement en tant que monitrice.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Patricia Kannouche : je te remercie de m'avoir acceptée, supportée et conseillée au sein de l'UMR8200 et des réunions de labo durant ces 5 années.

Un grand merci à toi, Said de m'avoir acceptée dans ton équipe dès le stage de master puis en thèse, et de m'avoir, chaque fois, confié un projet de recherche motivant. Tout au long de ces années, tu m'as guidée scientifiquement et techniquement. Tu m'as également permis de renforcer mon goût pour la recherche en me donnant l'opportunité de participer à des congrès nationaux et internationaux.
Je remercie les anciens et nouveaux membres de l'équipe « Plasticité du génome et cellule B », notamment Letecia pour les nombreux éclats de rire partagés, Dorine, Morwenna et Jacqueline.

Je remercie Bernard Lopez pour les discussions scientifiques passionnées et passionnantes, ses conseils avisés et sa disponibilité constante. Je remercie également tous les membres de l'équipe « REC » pour leur bonne humeur perpétuelle. Merci à Elodie, LaRagu, Nicolas, Fidel et au petit nouveau : Tangui. Un grand merci à Josée Guirouilh-Barbat, tu as pris le temps de m'encadrer, de me corriger et de me conseiller. Je suis fière d'avoir été ton Padawan (j'espère que tu comprendras la référence).

Mes remerciements s'adressent ensuite à Emmanuelle Despras. Sans qui ma thèse (ça fait too much si je dis ma vie ?) n'aurait pas été la même. Merci pour ton soutien sans faille, tes conseils scientifiques avisés, tes remarques professionnelles et personnelles sans détour et les bières partagées. Scientifiquement et humainement, tu es géniale! Merci également d'avoir pris le temps de corriger mon manuscrit et de m'avoir forcée à supprimer pas loin de 10 000 points-virgules ; Merci.

Je remercie tous mes collègues devenus amis, notamment mes compagnons de thèse (vous vous souvenez comme nous étions jeunes, frais et beaux avant ?) : Sana, Indiana, Noémie et Xavier. Merci également à Emilie, Valéria et Patrycja.

Merci à Fillippo, Jean, Alain, Jean-Claude, Murat, Sasha et Corinne pour toutes les discussions scientifiques et conseils qu'ils m'ont apportés tout au long de ma thèse.

Mes remerciements s'adressent maintenant à mes amis qui sont d'un soutien inaltérable lorsque la thèse vous apporte ses immanquables moments de doute.
Alexandre et Maxime merci d'être là depuis plus de 8 ans, tout simplement. Lucile, la prochaine c'est toi ! Ce n'est qu'une des nombreuses étapes qui nous restent à vivre ensemble. Je vous attends aux States (si, si).
Merci à Yohann, Hugues, Mathieu, Guillaume, Indiana, Astrid, Marie, Christophe, Muriel, Clémence, Céline, Alexis, Stan (et Harry) pour tous les bons moments partagés.

Merci à tous ceux que j'oublie mais qui me connaissent et donc me pardonneront.

Je tiens à remercier mes parents qui m'ont toujours soutenue et supportée pour donner le meilleur de moi-même dans mes études et mon travail et qui répondent toujours présents quand j'en ai besoin. Pour finir je remercie Pierre-Antoine et Clara, les gars, cette thèse, c'est pour vous !

Abréviations et anglicismes

53BP1 : p53 Binding Protein 1

A-EJ : NHEJ alternatif
Ac : Anticorps
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AID : Activation Induced cytidine Deaminase
APE : apurinic/apyrimidinic endonuclease
APLF : Aprataxin and PNKP-Like Factor
ARN : Acide Ribonucléique
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATP : Adénosine tri-phosphate
ATR : Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATRIP : ATR-interacting protein

BARD : BRCA Associated Ring Domain
BCL : B-cell lymphoma
BCR : B-Cell Receptor
BER : Base Excision Repair
BIR : Break-induced replication
BLM : Bloom syndrome protein
BRCA : BReast CAncer

C-NHEJ : NHEJ canonique
C-term : domaine carboxyle terminal
CDB : Cassure Double Brin
CDC : Cell division cycle
CDK : Cyclin Dependant kinase
CdL : Cornelia de Lange
CHD : Chromatin organization modifier
ChIP : Chromatin Immunoprecipitation
CHK : Checkpoint
CHLR1 : CHL1-related helicase gene-1
CHO : Chinese Hamster Ovary cells
CML : Leucémie Myéloïde Chronique
CO : Crossing Over
CoDACs : Cohesin DeACetylases
CPT : Camptothécine
CSB : Cassure Simple Brin
CSR : Class Switch Recombination ou Commutation de classe
CTCF : CCCTC-binding factor
CtIP : CtBP-Interacting Protein

dCs : deoxyCytidines
DDR : DNA Damage Response ou Réponse aux dommages de l'ADN
DIC : Domage Induce Cohesion
DMC : DNA Meiotic Recombinase
DNA-PK : DNA-dependent protein kinase
DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DT40 : Lignée cellulaire B aviaire
dUs : deoxyUridines

ECO : Establishment of cohesion protein
EJ : End-Joining
ERCC : Excision Repair Cross-Complementation
ESCO : Establishment of Cohesion homolog
EXO : eXOnuclease

FANC : Fanconi
FEN : Flap Structure-Specific Endonuclease
FHA : Forkhead associated
FoxO : Forkhead transcription factors

Gy : Gray
HDAC : Histone deacetylase
HEK : Human Embryonic Kidney
HMGB1 : High-Mobility Group protein
HMS : HyperMutation Somatique
HP :Heterochromatin Protein
HR : Recombinaison Homologue
HSP : Heat Shock Protein

Ig : ImmunoGlobuline
IL : InterLeukine
IR : Ionizing Radiation ou Radiations ionisantes
ISD : Internal switch deletion

JH : Jonctions de Holliday

KAP : Kinesin Associated Protein
KAT : K(Lysine) Acetyltransferase
kb : kilobase
KO : Knock-Out

Lig : Ligase

MAU : MAU2 sister chromatid cohesion factor
MCD1:Mitotic Chromosome Determinant
MCM : MiniChromosome Maintenance
Mec : Mitosis entry checkpoint protein
MEPS : Minimum efficiency processing segment
MH : Microhomology
MLH1 : MutL Homologue 1
MMBIR : Microhomology-Mediated Break Induced Replication
MMEJ : Microhomology (MH) -mediated end joining
MMR : MisMatch Repair
MMS : Mathyl Methane Sulfate
MRE : Meiotic recombination homolog
MRN : MRE11/RAD50/NBS1
MRX : Mre11/Rad50/Xrs2

N-term : domaine amino acide terminal
NBS : Nijemen breakage syndrome
NER : Nucleotide Excision Repair
NES : Nuclear Export Signal
NF-κB : Nuclear Factor-kappa B
NHEJ : Non-Homologous End-Joining ou Ligature d'extrémités non homologues
NIPBL : Nipped-B-like protein

ORC : Origin Recognition Complex

PARP : poly(ADP-ribose) polymerase
pb : paire de bases
PDS : Precocious Dissociation of Sister chromatids
PHD : Plant Homeo Domain
PIKK : phosphatidyl-inositol-3-OH kinase-related kinases
PLK1 : Polo Like Kinase
PNKP : PolyNucleotide Kinase/Phosphatase
Pol : Polymérase
PP2A : protein phosphatase 2A

PTIP : PAX transactivation activation domain-interacting protein

RAD : Mutants radiosensibles
RAD21L : RAD21 like protein
RAG : Recombination-Activating Gene
RAP : Receptor Associated Protein
RBS : Roberts syndrome
REC : recombinant proteins
RIF : Rap1-Interacting Factor 1
RMI1 : RecQ mediated genome instability
RNF : ubiquitin ligase RING finger
ROS : Reactive Oxygen Species
RPA : Replication Protein A
RSS : Recombination Signals Sequence

SA : Stromal Antigen
SCC : Sister Chromatid Cohesion
SCE : Sister Chromatid exchange
SCF : Skp1-Cul1-F box
SCID : Severe combined immunodeficiency
SDSA : Synthesis-dependent strand annealing
Ser : Sérine
shARN : Small Hairpin ARN
siARN : small interfering ARN
SIRT : Silent Mating Type Information Regulation Homolog
SMC : Structural Maintenance of Chromosome
SOD : SuperOxyde Dismutase
SPO : Mutants de Sporulation
SSA : Single-strand annealing
STAG : Stromal Antigen
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
SWI / SNF : SWIth/Sucrose NonFermentable

T-SCE : Telomere Sister Chromatid Exchange
tADN : ADN de transfert
TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TERRA : telomeric repeat-containing RNA
Thr : Thréonine
TIFs : Telomere Dysfunction-Induced Focus
TIP : Tat-interactive protein
TLS : synthèse translésionnelle
TRF : Telomeric Repeat binding factor
TSS : Transcription Start Site

UNG : Uracil-N Glycolsylase

V(D)J : Recombinaison V(D)J

WAP : Wings Apart-like homolog
WRN : Werner syndrome

XLF : XRCC4-like factor
XP : Xeroderma Pigmentosum
XRCC : X-Ray repair cross-complementing protein

Sommaire

Remerciements 4
Abréviations et anglicismes 7
Avant-propos 13
Introduction 14
Stabilité et diversité de l'information génétique : importance du mécanisme de religature d'extrémités non homologues de l'ADN (NHEJ) 14
A. Les cassures double brin (CDB) : origine et signalisation 14
1. Origine des CDB 14
i. Cassures accidentelles 14
ii. Cassures enzymatiques programmées 16
2. Signalisation des CDB : La réponse aux dommages de l'ADN (DDR) 17
i. Modification de la chromatine endommagée 17
ii. Les kinases PIKK et les PARP 17
iii. Arrêts de cycle ; activation des checkpoints 18
iv. L'activation d'ATM, boucle d'autorégulation et modifications d'histones 18
v. Inhibition de la DDR, le cas des télomères 19
B. Réparation des CDB : C-NHEJ & RH, A-EJ 21
1. La Recombinaison Homologue (RH) 21
i. La résection d'ADN simple brin 21
ii. L'invasion et échange de brin 22
iii. La résolution des jonctions de Holliday (JH) 22
iv. Stabilité, diversité du génome et RH 22
2. Le C-NHEJ 25
i. Détection de la cassure : Le complexe Ku 25
ii. Le complexe DNA-PK 25
iii. Maturation des extrémités : Artémis, polymérases X, TdT et autres facteurs 26
iv. Ligature des extrémités : XRCC4, l'ADN ligase IV et Cernunnos 27
v. Dissociation du complexe NHEJ 27
3. Le NHEJ alternatif : l'A-EJ 27
i. Détection de la cassure : PARP1 28
ii. Résection : MRN/CtIP 28
iii. Maturation des extrémités 29
iv. Ligature des extrémités : XRCC1 et l'ADN Ligase III 29
C. Importance du NHEJ dans la diversité génétique 32
1. Lymphocytes B, recombinaison V(D)J et le complexe RAG 32
2. Lymphocytes B matures, commutation de classe (CSR) et AID 37
3. Pathologies associées à un défaut de EJ 42

Régulation du EJ: Résection et translocations 43

A. Régulation de la résection 43

1. Hétérodimère Ku 43

2. Les complexes 53BP1-RIF1-PTIP, BRCA1-CtIP et BLM 44

i. Inhibition de la résection : 53BP1, RIF1 et PTIP 44

ii. Stimulation de la résection : BRCA1/CtIP 45

iii. Les agents doubles : BLM, BRCA1 et Rif1 45

3. Le cas de RAG 46

4. CSR et A-EJ 46

5. Transcription et RH 46

B. NHEJ, translocations et cancer 49

1. Translocations et chromothripsis 49

2. NHEJ et translocations 50

3. Formation de translocations, facteurs impliqués 51

i. Organisation spatiale du génome 51

ii. Régulation de la mobilité des CDB 53

iii. Formation de la synapse, rapprochement des extrémités 53

Le complexe de cohésion 55

A. Rôle canonique : la cohésion des chromatides sœurs 55

1. Description du complexe et régulation de la cohésion 55

i. Anneau de cohésion 55

ii. Cycle cellulaire 56

2. Réparation post réplicative 56

i. Checkpoint G2/M et RH 56

ii. Architecture et mobilité de la chromatine endommagée 58

iii. Téloméres 58

B. Rôle en cis : Formation de bloucles chromatiniennes 59

1. Transcription 59

2. Réplication, allumage des origines de réplication et sites fragiles 60

3. Complexe de cohésion, V(D)J et CSR 61

i. V(D)J 61

ii. CSR 63

C. Cohésinopathies et cancer 63

1. Cohésinopathies 63

2. Cancer 64

Objectifs de la thèse et cheminement scientifique 66

Résumé de l'article 1 84

Résultats complémentaires (article 1) 97

Résumé de l'article 2 99

Discussion 133

L'efficacité du EJ est dépendante de la distance séparant deux CDB 133

A. La religature d'extrémités distales propice aux réarrangements complexes est majoritairement éffectuée par l'A-EJ 133

1. Efficacité du C-NHEJ et de l'A-EJ 133

2. Initiation de la résection, grandes délétions et réarrangements 134

B. Complexe de cohésion et NHEJ 138

1. Le complexe de cohésion inhibe le EJ d'extrémités distales 138

2. Altération du recrutement de 53BP1 en absence du complexe de cohésion 140

RAD21 et réplication 143

RAD21 et réplication télomérique 144

RAD21 et diversification des gènes des immunoglobulines 147

Conclusions 151

Table des illustrations 152

Bibliographie 153

Avant-propos

La protection de l'information génétique, et donc de l'ADN, est essentielle à la vie/survie cellulaire. Des systèmes de réparation divers et variés ont donc été mis en place afin de maintenir la stabilité du génome. Ceux-ci agissent de manière spécifique en fonction du cycle cellulaire et/ou du type de lésions. La perte ou le dysfonctionnement d'un acteur protéique de la réparation étant le plus souvent à l'origine d'événements tumoraux, la régulation et l'action de ces systèmes peuvent apparaître comme totalement figées, reflétant un schéma simple : Lésions → Réparation → Maintien de l'information génétique.

Au cours de ma thèse j'ai pu entrevoir un autre aspect de ces systèmes de réparation : leur implication dans la diversité et l'adaptabilité de l'information génétique. Principes essentiels à la méiose et à la mise en place d'un système immunitaire opérationnel pouvant répondre à l'infinité d'agents pathogènes présents et en constante mutation. Cette adaptabilité passe par la reconnaissance de lésions physiologiquement programmées et par le maintien d'événements mutagènes par les protéines réparatrices, nous amenant à revisiter complétement notre schéma : Lésions → Réparation ou Mutation → Maintien ou génération de la diversité de l'information génétique.

Le « détournement » physiologique et programmé de protéines de la réparation lors de processus mutagène comme l'hypermutation somatique (HMS) des gènes des immunoglobulines (Igs) au sein des lymphocytes B, reste encore partiellement incomprise et passionnante. Au début de mon doctorat nous avons identifié, par une approche protéomique couplée à l'identification par spectrométrie de masse, le complexe de cohésion comme potentiel acteur des mécanismes de diversification des gènes des Ig. Nous avons donc procédé à la caractérisation de souris hétérozygotes pour une sous-unité du complexe : RAD21. Parallèlement, nous avons tenté d'inactiver le gène *RAD21* au sein d'une lignée lymphocytaire murine. En collaboration avec l'équipe de Bernard Lopez, nous avons testé l'implication de RAD21 dans un mécanisme de réparation des cassures double brin, la ligature d'extrémités non homologues ou NHEJ, mécanisme essentiel à la CSR. Les premiers résultats obtenus avec les substrats se sont révélés extrêmement intéressants : l'effet de RAD21 sur la réparation par NHEJ semblait dépendre de la distance séparant deux extrémités de cassures double brin. Devant ce résultat inattendu, nous avons décidé de nous focaliser sur l'implication de RAD21 dans le NHEJ faisant suite à des cassures non programmées.

Mon introduction sera consacrée à la présentation du NHEJ, sa régulation et son implication dans la stabilité et la diversité de l'information génétique. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons aux multiples rôles du complexe de cohésion en nous focalisant sur son implication dans la réparation des cassures double brin de l'ADN.

Introduction

Stabilité et diversité de l'information génétique : importance du mécanisme de religature d'extrémités non homologues de l'ADN (NHEJ)

Afin de répondre à la diversité des lésions, la cellule eucaryote possède cinq mécanismes de réparation bien caractérisés qui permettent la préservation de l'information génétique au cours du cycle cellulaire. La **réparation par excision de base** (**BER**), la **réparation par excision de nucléotide** (**NER**) et **la réparation des mésappariements** (**MMR**) permettent de gérer respectivement, les cassures simple brin et les sites abasiques, les bases modifiées entraînant une déformation de la double hélice d'ADN et les mésappariements et les petites insertions/délétions faisant suite à des erreurs réplicatives ou des agents génotoxiques. Les cassures double brin (CDB), *i.e* la rupture physique des deux brins d'ADN, sont potentiellement les lésions les plus délétères pour la cellule : Elles peuvent entraîner une perte majeure d'information génétique, de nombreux réarrangements préludes ou favorisant à la progression tumorale, un arrêt de la prolifération cellulaire, l'apoptose ou la sénescence. Deux mécanismes permettent de restaurer l'intégrité physique de l'ADN après une cassure double brin : **La recombinaison homologue** (RH) et **le NHEJ canonique** (C-NHEJ). Ces mécanismes limitent la perte d'information génique. Le premier permet la synthèse réparatrice d'ADN à partir d'une matrice et le deuxième la religature directe des extrémités d'ADN, sans nécessité d'homologie de séquence. Un troisième mécanisme permet la religature des extrémités d'une CDB ou « end-joining » (EJ) : **le NHEJ alternatif** (A-EJ). L'A-EJ agit en absence du C-NHEJ et mène à une religature des extrémités « à tout prix » pouvant générer de larges délétions et une perte majeure d'information.
Chez *S. cerevisae,* une seule CDB, provoquée enzymatiquement dans un plasmide non intégré et ne comportant aucun gène essentiel du génome, non réparée entraîne l'arrêt de la prolifération et la mort cellulaire (Bennett et al., 1993). Ce résultat reflète non seulement l'importance de la réparation mais également celle de la signalisation des CDB.
Les sources des CDB (exogène ou endogène), leur signalisation et leur prise en charge par le NHEJ ou la HR dans les cellules de mammifères sont décrites ci-dessous.

A. Les cassures double brin (CDB) : origine et signalisation

1. Origine des CDB

i. Cassures accidentelles

La structure compacte de la chromatine et l'ensemble des protéines liant l'ADN simple brin permettent de limiter l'accéssibilité de l'ADN. Cependant, à chaque division, la décondensation transitoire de l'ADN durant la transcription et la réplication l'expose à une multitude de lésions simple-brin émanant de processus cellulaires, des nucléases endogènes et

d'agents exogènes. Il a été estimé qu'environ 1% de ces lésions simple brin sont converties en cassures double brin, le taux d'apparition de celles-ci étant d'environ 50 CDB au cours d'un cycle cellulaire (Pour revues: Vilenchik & Knudson, 2003, Lieber, 2010 et Ciccia & Elledge, 2010).

Lésions endogènes : Métabolisme / Réplication / Télomères.

-Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Lors de la respiration cellulaire, la mitochondrie produit des ROS par la transformation de l'oxygène en superoxyde 0_2^-. La conversion de ce dernier par l'enzyme superoxyde dismutase mitochondriale SOD1 et l'enzyme cytosolique SOD2 aboutie à la formation de **radicaux libres** hydroxyles (HO•) potentiellement mutagènes. En effet, HO• provoque l'oxydation de bases guanines et adénines formant des bases modifiées et des cassures simple brin (CSB) (Yinsheng Wang, 2008)**.** Dans ces conditions, une CDB peut résulter de deux CSB se trouvant à proximité sur les deux brins opposés de l'ADN. La cellule en produisant environ 10^9 par heure, les ROS sont considérés comme l'une des causes majeures de CDB.

-Réplication

Lors de la réplication du matériel génétique, les fourches de réplication rencontrent de nombreux obstacles pouvant les ralentir, les stopper momentanément ou les arrêter et entraîner une dissociation du réplisome. On parle de **fourches bloquées « stalled forks »** pouvant s'effondrer ou collapser **« collapsed forks »** (Carr & Lambert, 2013, Carr et al., 2011). Les hybrides ARN/ADN, les protéines liées à l'ADN (e.g. aux centromères), les bases modifiées et les structures nucléiques secondaires tels que les G-quadruplexes sont des exemples de barrières pouvant entraîner un blocage de fourche. Malgré la présence de mécanismes permettant le redémarrage de la synthèse réplicative, une partie des fourches bloquées collapsent, et génèrent des CDB via leur clivage par des endonucléases spécifiques (Saintigny, 2001, Weinert et al., 2009).

-Télomères

Les télomères sont des terminaisons spécialisées permettant la protection des extrémités chromosomiques. Une organisation conformationnelle de l'ADN complexe (extrémité 3' G-overhang, T-Loop et G-quadruplex) et une coiffe protéique protectrice, le complexe Shelterin, évitent que les extrémités chromosomiques ne soient reconnues comme CDB (pour revue : Donate & Blasco, 2011)**.** Ainsi, un dysfonctionnement télomérique tel que l'inactivation du gène *TRF2* codant une protéine clé du complexe shelterin, TRF2 ou « Telomere Repeat binding factor 2 », entraîne une **déprotection des terminaisons chromosomiques** et des fusions télomériques résultant d'une activation de la réparation par NHEJ (Sfeir & de Lange, 2012). Les fusions télomériques découlant de la reconnaissance des télomères comme CDB seront évoquées ultérieurement.

Lésions exogènes: Radiations ionisantes (IR), agents chimiques & chimio-thérapeutiques

- Radiations ionisantes (IR)

L'exposition aux IR tels que les rayons gamma et les rayons X peut provoquer des CDB de manière directe ou par induction d'un stress oxydant après génération de radicaux libres. La

génération de cassures de cassures double brin ciblée est une stratégie anticancéreuse. Elle peut être effectuée par irradiation directe de la tumeur ou par administration de radiomimétiques mimant les effets des rayonnements ionisants.

- Agents chimiques

Les radiomimétiques tels la bléomycine ou la néocarzinostatine sont d'une haute toxicité cellulaire ; ils induisent, à faible dose, des CSBs en grande quantité pouvant mener à l'apparition de CDB (Povirk, 1996). Les inhibiteurs des ADN topoisomérases I ou II, tels que la camptotecine et l'etoposide (CPT), entrainent l'apparition de CDB par un blocage massif des fourches réplicatives (Pommier, 2010). De la même manière, les agents alkylants tel le methylmethane sulfonate (MMS) provoquent des CDB par ajout de résidus alkyles aux sites nucléophiles de l'ADN, entraînant le blocage des fourches (Wyatt & Pittman, 2006). La bléomycine et des dérivés solubles de la CPT sont utilisés en chimiothérapie, un grand nombre d'autres agents sont instables ou ont des effets secondaires trop néfastes pour une application clinique.

Les cassures double brin altèrent la structure physique des chromosomes et entraînent, dans certains cas des phénomènes de translocations par recombinaison homologue ou NHEJ aberrant (voir chapitre concerné). Cependant, la génération enzymatique de CDB à des loci spécifiques et une régulation fine de leur réparation est à l'origine de l'extrême et indispensable variabilité de l'information génétique des cellules germinales et des cellules lymphocytaires T et B.

ii. Cassures enzymatiques programmées

La méiose et Spo11

La diversité et l'évolution du génome passent par la création perpétuelle de nouvelles combinaisons alléliques au sein des cellules germinales. Celle-ci est rendu possible par la génération de cassures programmées par les deux isoformes de l'enzyme **SPO11** : SPO11α et SPO11β. Un complexe SPO11 homodimérique se lie à l'ADN et, avec d'autres partenaires protéiques, crée une CDB prise ensuite en charge par la machinerie de résection prélude à **la recombinaison homologue, avec crossing-over** (CO), qui sera abordée plus loin (De Massy, 2013). Une analyse des événements de CO par séquençage du polymorphisme nucléotidique au sein du génome de 82 familles (ou Genome-wide single-nucleotide polymorphism) a été effectuée en 2008. Il a été estimé que le génome humain contenait environ 23 000 points chauds (ou « hotspots ») de CDB générées par SPO11, d'environ 1 à 2 kb et distants de 50 à 100 kb (Coop, 2008). Ceux-ci sont hautement variables d'un individu à l'autre. Les propriétés exactes des hotspots n'ont pas encore totalement été élucidées. Seules une architecture chromatinienne spécifique « axis-loop structure » et la présence de l'histone H3 tri méthylé sur la lysine K4 aux hotspots ont été décrites attestant d'un relâchement de la chromatine facilitant la fixation de SPO11 à l'ADN.

Création du répertoire immunitaire

Deux mécanismes extrêmement régulés permettent la génération de la diversité des gènes des immunoglobulines (Ig) : La recombinaison V(D)J et la commutation de classe CSR. Ces mécanismes qui nécessitent l'action du NHEJ seront abordés dans le prochain chapitre.

2. Signalisation des CDB : La réponse aux dommages de l'ADN (DDR)

La réponse cellulaire aux dommages de l'ADN ou DDR (DNA Damage Response) s'effectue via un réseau de signalisation complexe qui coordonne le recrutement des protéines de la réparation, la régulation de la transcription et l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire (ou checkpoints). Cette réponse intervient également dans la réorganisation de l'architecture chromatinienne de l'ADN endommagé évitant ainsi la diffusion de la DDR dans le génome entier. Cette réponse se doit d'être rapide et efficace mais également réversible une fois la réparation effectuée afin de lever l'inhibition de cycle instaurée par les checkpoints et de dissocier les complexes de réparation liés l'ADN. Ainsi, les mutations touchant des protéines de la DDR ou des protéines impliquées dans son inhibition peuvent conduire à une réparation aberrante et une dérégulation des checkpoints ayant pour conséquences l'arrêt du cycle, la mort cellulaire ou l'instabilité génomique (Harper & Elledge, 2007, Panier & Durocher, 2013).

i. Modification de la chromatine endommagée

Les lésions de l'ADN entraînent une altération physique et un remodelage local et global de chromatine (Kruhlak, Celeste, & Nussenzweig, 2006). Il a récemment été décrit que les perturbations chromatiniennes suffisaient à l'induction d'un checkpoint indépendamment de la présence de lésions, indiquant le contrôle constant de l'architecture chromatinienne par la cellule. Même si l'ensemble des acteurs permettant ce remodelage n'est pas connu, cette signalisation passe par les modifications d'histones (Polo & Jackson, 2011). L'histone H3 tri-méthylé sur la lysine 9 (H3K9me3) permet l'accumulation et l'activation de l'acétyle transférase **TIP60** (ou KAT5) à la chromatine endommagée. La forme active de TIP60 (phosphorylée sur la tyrosine 44) permet l'acétylation d'ATM sur la lysine 3016, son autophosphorylation et l'activation des checkpoints (Kaidi & Jackson, 2013).

ii. Les kinases PIKK et les PARP

La détection et la signalisation des dommages sont initiées par des complexes senseurs-kinases de la famille des PIKK (phosphatidyl-inositol-3-OH kinase-related kinases) et par des membres de la famille des PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) : PARP1 et PARP2. Il existe six membres de la famille des PIKK dont trois impliquées dans la DDR : ATR, DNA-PKcs et ATM. Bien qu'ayant une affinité pour l'ADN, le recrutement des PIKK au dommage est facilité par leur interaction avec un motif carboxyle-terminal conservé des protéines senseurs RPA, Ku et NBS1. (Falck, 2005). La kinase **DNA-PKcs** (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) est recrutée après l'accrochage du complexe **Ku** (Ku70/Ku80) aux extrémités d'une **cassure double-brin** formant ainsi une kinase DNA-PK active (DNA-dependent protein kinase), complexe initiateur de la réparation par NHEJ (Gottlieb & Jackson, 1993). Le recrutement de **NBS1**, protéine du complexe MRN

(MRE11/RAD50/NBS1), fait également suite à la génération de **CDB** et permet le recrutement d'**ATM**. La kinase **ATR** (ATM and RAD3-related) est recrutée et activée suite à l'accumulation de la protéine **RPA** au niveau de **l'ADN simple-brin** et via le domaine C-terminal de la protéine **ATRIP** (Zou & Elledge, 2003, Unsal-Kaçmaz & Sancar, 2004). Cet ADN simple brin peut-être généré au niveau de fourches de réplication bloquées ou après résection de l'ADN double brin (Cimprich & Cortez, 2008). Les protéines **PARP** (Poly(ADP-ribose) polymerase proteins) sont des glycosyltransférases qui permettent le transfert d'un ribose ADP négatif à un groupement donneur NAD positif i.e les résidus Glu, Asp et Lys. Cette modification post-traductionnelle se nomme la **PARylation** (poly(ADP-ribosyl)ation) et permet de moduler l'expression de certains gènes ainsi que la localisation et l'activité de nombreuses protéines. Parmi les 17 PARP décrites, trois ont une localisation nucléaire et une activité enzymatique dépendante de leur interaction avec l'ADN : PARP1, PARP2 et PARP3. **PARP1** est la mieux caractérisée : elle se lie à l'ADN via son domaine N-term et devient enzymatiquement active après reconnaissance d'une structure anormale telle qu'une cassure simple ou double brin. Son activation permet la modification post-traductionnelle des histones H1 et H2B et de p53 entraînant une relaxation de la structure chromatinienne et un arrêt du cycle cellulaire préludes au recrutement des protéines de réparation (Revue : Gibson & Kraus, 2012).

iii. Arrêts de cycle ; activation des checkpoints

L'activation des checkpoints est rendue possible grâce à une cascade de phosphorylation découlant majoritairement de l'activation des PIKK **ATR** et **ATM** et de la phosphorylation de leurs cibles **CHK1** et **CHK2** sur leur domaine SQ/TQ. Celles-ci vont inhiber la formation et/ou l'activation des complexes CDK/cyclines, complexes essentiels au passage de la cellule à travers les phases du cycle cellulaire. En phase **G1**, l'arrêt de cycle implique la stabilisation et l'activation de **p53**, qui va activer p21, inhibiteur de la formation du complexe CDK2/cyclinE. Différentes phosphorylations de p53 sur son domaine N-term le rendent actif. Celles-ci peuvent être effectuées directement par ATM et ATR, et DNA-PK ou indirectement via CHK1 et CHK2. (Shieh et al., 2000, Sheau, 1997, Chehab et al., 2000). **En phase S**, CHK2 permet l'inactivation par phosphorylation de **CDC25A** ce qui engendre l'inactivation de CDK2 et inhibe le chargement de CDC45 aux origines de réplication contrecarrant leur allumage. De plus, MRN et CHK2 permettent le ralentissement des fourches réplicatives (Falck et al., 2002). L'arrêt en **G2/M** fait suite à l'inactivation par phosphorylation de la phosphatase **CDC25C** empêchant l'activation du complexe CDK1/cyclineB (Chen & Poon, 2008, Kaneko et al., 1999). En mitose, la DDR est inactive : l'apparition de cassures double-brin ou de dommages télomériques entraîne un arrêt de cycle dépendant de p53 en phase G1 (Giunta & Jackson, 2011, Cesare et al., 2013).

L'activation d'ATM et de la voie de signalisation en découlant est cruciale pour la réparation des CDB. Les patients atteints d'Ataxie télangiectasie (mutés pour le gène *ATM*) sont immuno-déficients, radiosensibles et ont un risque accru de développer des tumeurs, conséquences directes d'un défaut de réparation des CDB.

iv. L'activation d'ATM, boucle d'autorégulation et modifications d'histones

ATM existe en complexe homodimérique inactif. Après son recrutement aux CDB son activation est rendue possible par une dissociation du complexe et une autophosphorylation sur la sérine 1981 (Bakkenist & Kastan, 2003). Cette autophosphorylation faisant suite à son recrutement par NBS1 et/ou KAP5 doit être amplifiée et doit perdurer le temps que l'intégrité physique de l'ADN n'est pas restaurée (Lee & Paull, 2004, Uziel et al., 2003, Kaidi & Jackson, 2013). Pour ce faire, une boucle de rétro-régulation (feedback loop) se met rapidement en place: ATM phosphoryle la sérine 139 de l'histone variant H2A.X formant **γH2A.X**, celui-ci recrute la protéine **MDC1** (mediator of DNA damage checkpoint protein 1), le complexe MDC1- γH2A.X interagit avec NBS1, permettant le recrutement de plus de complexe MRN et donc le recrutement et l'autophosphorylation d'ATM (Stucki et al., 2005). Cette boucle de régulation permet d'étendre le « signal » de réparation via la dispersion de γH2A.X sur une région d'environ 2Mb (Massip et al., 2010, Berkovich et al., 2007). ATM phosphoryle également MDC1 ce qui conduit au recrutement des ubiquitine ligases E3 **RNF8** et **RNF168** (ubiquitin ligase RING finger). De nombreuses modifications d'histones font suite à l'activation de ces E3 et permettent le recrutement des protéines de la réparation **(Figure 1).** Par exemple, l'ubiquitination de l'histone H2A sur la lysine 15 (H2AK15ub) recrute 53BP1 (p53 binding protein 1), nécessaire à la protection des extrémités d'ADN double brin (Panier & Boulton, 2014). La décondensation de la chromatine endommagée permet son accessibilité aux différents acteurs de la réparation. ATM phosphoryle KAP1 et permet la décondensation de l'hétérochromatine (Ziv et al., 2006). Le complexe γH2A.X/MDC1 permet l'accumulation de facteurs de remodelage de la chromatine tels que PAND1, CHD4 et les complexes NuA4 (formé de p400 et TIP60) et Ino80. γH2A.X seul permet l'acétylation de l'histone H3 par recrutement de GCN5, créant un terrain favorable au recrutement de l'ATPase SWI/SNF BRG1 qui favorise l'expansion du signal γH2A.X (Downs et al., 2004, Van Attikum et al., 2004, Polo et al., 2010).

v. Inhibition de la DDR, le cas des télomères

L'inhibition de la DDR après réparation du dommage est essentielle pour le désassemblage des complexes protéines/ADN et pour la levée de l'inhibition de cycle contrôlée par les checkpoints. Cette inactivation qu'en partie décrite se fait par des modifications post-traductionnelles touchant γH2A.X, MDC1 et les RNF (pour revue : (Panier & Durocher, 2013)).

Au niveau des télomères, la DDR doit être inhibée afin d'éviter la prise en charge des extrémités chromosomiques par le NHEJ et la génération de fusions de chromosomes ou de chromatides sœurs. L'inhibition de la DDR en mitose est contrôlée localement par **TRF2** qui permet la formation de structures dites « T-loop » au niveau des télomères : les extrémités ne sont ainsi pas reconnues comme CDB et la kinase ATM n'est pas activée. De plus, l'interaction directe de TRF2 avec le complexe **Ku** (via le domaine hélix 5 de Ku70) (1) empêche la formation d'une synapse de réparation prélude au NHEJ (Ribes-Zamora et al., 2013) et (2) recrute la dé-ubiquitase BRCC3 et l'ubiquitine ligase UBR5, toutes deux contrecarrant l'activité de **RNF168** (Okamoto et al., 2013). Une **inhibition globale** de la DDR se fait égalemement dès l'entrée en mitose : **CDK1** induit la phosphorylation inhibitrice de **53BP1** et **RNF8** empêchant leur fixation à l'ADN (Orthwein et al., 2014). La levée de l'inhibition de la DDR n'est possible qu'après activation de la phosphatase PP4C à l'entrée en G1 (Lee et al., 2014).

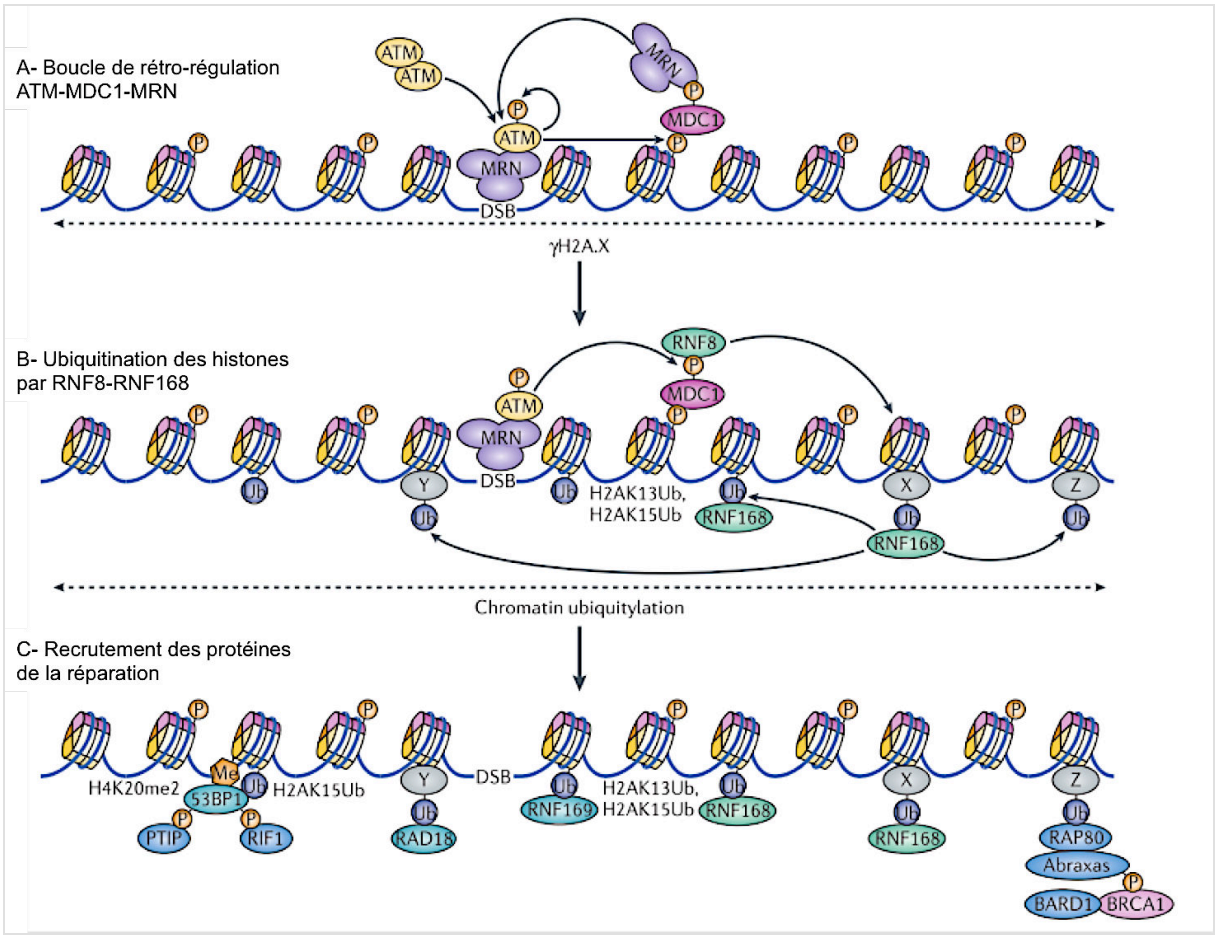


Figure 1 : La signalisation par ATM et les modifications chromatiniennes

a | La DDR est initiée par le recrutement du complexe MRN (MRE11–RAD50–NBS1) et de la forme monomérique active autophosphorylée d'ATM. La boucle de rétro-régulation implique ATM, MDC1 et MRN et permet d'amplifier la DDR. H2A.X est phosphorylé sur la sérine 139 par ATM (γH2A.X), cette marque d'histone s'étend de part et d'autre de la CDB (pointillés).

b | ATM phosphoryle MDC1 sur ses motufs Thr-Gln-Xaa-Phe (TQXF), qui sont reconnus par RNF8. Les cibles ubiquitinées de RNF8 (X) recrutent une seconde RNF : RNF168. Le recrutement de RNF8 et RNF168 induit une cascade d'ubiquitination dont les cibles n'ont probablement pas toutes été décrites (Y et Z). L'histone H2A est ubiquitiné sur deux motifs. RNF168 peut se lier à ses propres substrats ; H2AK13ub et H2AK15ub et ainsi auto-amplifier son recrutement et étendre l'ubiquitination de la chromatine autour de la CDB.

c | Les cibles de l'activité de RNF168 sont également reconnus par d'autres protéines telles que RNF169, RAD18 et RAP80 (receptor-associated protein 80). 53BP1 (p53-binding protein 1) se lie à H4K20 (H4K20me2) et H2AK15ub. BRCA1 et recruté avec BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1) via Abraxas et la fixation de RAP80 à une cible ubiquitinée non identifiée.

B. Réparation des CDB : C-NHEJ & RH, A-EJ

Trois mécanismes permettent de restaurer l'intégrité physique de l'ADN après une cassure double brin : La recombinaison homologue (RH) et deux mécanismes de religature des extrémités (ou EJ ; End Joining) : le NHEJ canonique (C-NHEJ) et la NHEJ alternatif (A-EJ). La RH et le C-NHEJ limitent la perte d'information génétique. Le premier permet la synthèse d'ADN à partir d'une matrice homologue après une résection 5'→3' et invasion de brin et le deuxième la religature directe des extrémités d'ADN sans résection et sans nécessité d'homologie de séquence. L'A-EJ, qui agit en absence du C-NHEJ, mène à une religature des extrémités impliquant de larges délétions découlant d'une résection 5'→3' et une perte majeure d'information.

1. La Recombinaison Homologue (RH)

La recombinaison homologue est l'échange de molécules d'ADN présentant des homologies de séquence. La RH est initiée par une résection d'ADN simple brin générant une queue sortante 3' puis par l'invasion d'un ADN double brin homologue par cet ADN simple brin ce qui conduit à un échange de brin. L'échange de brins homologues crée des structures cruciformes appelées **jonctions de Holliday** pouvant être résolues suivant deux orientations et générant ou non un échange de séquences adjacentes i.e **un crossing over** (CO) (Holliday 1964). Le besoin en homologie de séquences entre les deux molécules partenaires introduit le concept de **MEPS** (Minimum efficiency processing segment) : l'efficacité de la RH décroit progressivement avec la réduction de la taille des segments d'ADN présentant des homologies parfaites. Le MEPS chez les mammifères est estimé entre 200 et 250 nucléotides, reflétant la nécessité d'une grande résection simple brin (Liskay 1987, Lopez 1992, Rubnitz et Subramani 1984, Grabarz et al., 2012). Les différents types de RH sont décrits figure 2. La RH conduit donc à un échange non réciproque d'information génétique : la conversion génique qui peut avoir lieu suite à un CO ou non (figure 2A). Le modèle de recombinaison proposé pour la réparation des CDB est présenté figure 2A, il implique une conversion génique avec ou sans CO. (Mazón, Mimitou, & Symington, 2010, Grabarz et al., 2012).

i. La résection d'ADN simple brin

La résection se déroule en deux étapes : l'initiation et l'extension. L'initiation est une résection limitée de l'extrémité 5' qui fait intervenir le complexe MRN et la protéine CtIP (Sae2 chez la levure). La protéine **CtIP** (CtBP (C-terminal binding Protein)-Interacting Portein) interagit avec MRN (Sartori 2007) grâce ses résidus phosphorylés qui se lient au domaine FHA de NBS1 (Williams 2009). **MRN** se fixant sur 200 nucléotides autour de la cassure, ces protéines éliminent de la CDB quelques dizaines de nucléotides (jusqu'à 200 nts) afin de créer une queue 3' sortante. L'extrémité simple brin formée est alors un substrat pour l'exonucléase **EXO1** qui est recrutée par MRN et CtIP (Bolderson 2010, Zhou, 2014). La nucléase **DNA2** est également impliquée en S/G2 dans cette étape d'extension de la résection, elle agit en complexe avec l'hélicase **BLM** ou l'hélicase **WRN** (Nimonkar et al., 2011, Grabarz et al., 2013, Sturzenegger et al., 2014). EXO1 et le complexe DNA2-BLM réalisent une résection plus processive permettant ainsi la production d'un ADN simple brin 3' sortant

qui envahira le brin homologue intact nécessaire à la réparation (Nimonkar et al., 2008, You et al., 2009, Mimitou & Symington, 2008, Gravel et al., 2008).

ii. L'invasion et échange de brin

L'ADN simple brin provenant de l'étape de résection est protégé par l'hétérodimère **RPA**. Le complexe **BRCA** constitué des protéines BRCA1 et BRCA2 reliées par la protéine PALB2 permet la relocalisation de **RAD51** au niveau de l'ADN simple brin, créant ainsi un filament actif prélude à l'invasion de brin (revue Tischkowitz 2010, Holthausen 2010). BRCA1 est recruté par MRN ou RAP80 aux sites de dommages. PALB2 est indispensable à la formation de foyers BRCA2 et RAD51, cependant c'est BRCA2, qui par son interaction avec RAD51, permet son recrutement au niveau de l'ADN simple brin protégé par RPA. Une fois le filament RAD51 formé, l'extrémité 3' envahi un ADN duplex homologue intact créant une amorce d'ADN 3' permettant la polymérisation et la formation d'une boucle de déplacement ou D-loop. La polymérisation déplace la D-loop (Displacement loop) qui peut capturer l'ADN simple brin libre complémentaire créant deux jonctions de Holliday (JH). RAD54 stabilise cette étape (revue Mazin 2010). La polymérisation comble la brèche et les JH peuvent migrer allongeant ainsi la région d'hétéroduplex. Il existe 5 paralogues de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3) qui facilitent ces différentes étapes mais dont les rôles moléculaires restent à déterminer.

iii. La résolution des jonctions de Holliday (JH)

La résolution des JH est essentielle à la bonne ségrégation chromosomique lors de la division cellulaire. Elles peuvent être résolues par des endonucléases spécifiques (**SSE**) ou bien dissoutes par l'action conjointe de l'activité hélicase de la protéine **BLM** et **Top3alpha** et RMI1 (Wu et Hickson 2003). Chez les eucaryotes, il existe trois classes de SSE : la famille ERCC4 (XPF et MUS81), UvrC (SLX1) et XPG (Gen1). Une autre résolvase vient d'être caractérisée : SLX4 qui servirait de plate forme d'assemblage des SSE (Fekairi 2009, Munoz 2009, Svendsen 2009). La résolution des JH peut conduire à des événement avec ou sans CO (suivant le sens de clivage) alors que la dissolution des JH ne permet pas l'apparition de CO.

iv. Stabilité, diversité du génome et RH

Comme évoqué précédemment, la RH intervient dans le brassage et la ségrégation allélique durant la méiose. Lors de ce mécanisme, DMC1, un paralogue de RAD51 intervient aussi et assure l'invasion de brin. L'implication de la RH et du NHEJ dans la stabilité et la diversité de l'information génétique est discutée dans (Bétermier, Bertrand, & Lopez, 2014) et (Guirouilh-Barbat, Bertrand et Lopez, 2014). En plus de la réparation des CDB, la RH assure la tolérance des dommages et le redémarrage des fourches durant la réplication. En effet, si la fourche de réplication rencontre une lésion, la RH assure le changement de matrice : la polymérase réplique à partir de l'ADN de la chromatide sœur intact. Ce mécanisme se déroule parallèlement à la synthèse trans-lésionnelle (TLS), qui n'implique pas un changement de matrice mais un changement de polymérase : la polymérase réplicative est échangée contre une polymérase spécialisée dans TLS (Kannouche et al., 2004). L'interface réplication/réparation est intéressante dans le traitement des tumeurs déficientes pour la RH.

Par exemple, le traitement des tumeurs BRCA1 ou BRCA2 par un inhibiteur de PARP génère un stress réplicatif conduisant à la génération de CDB durant la réplication, ces cellules tumorales déficientes pour la RH sont donc extrêmement sensibilisées (Bryant 2005).

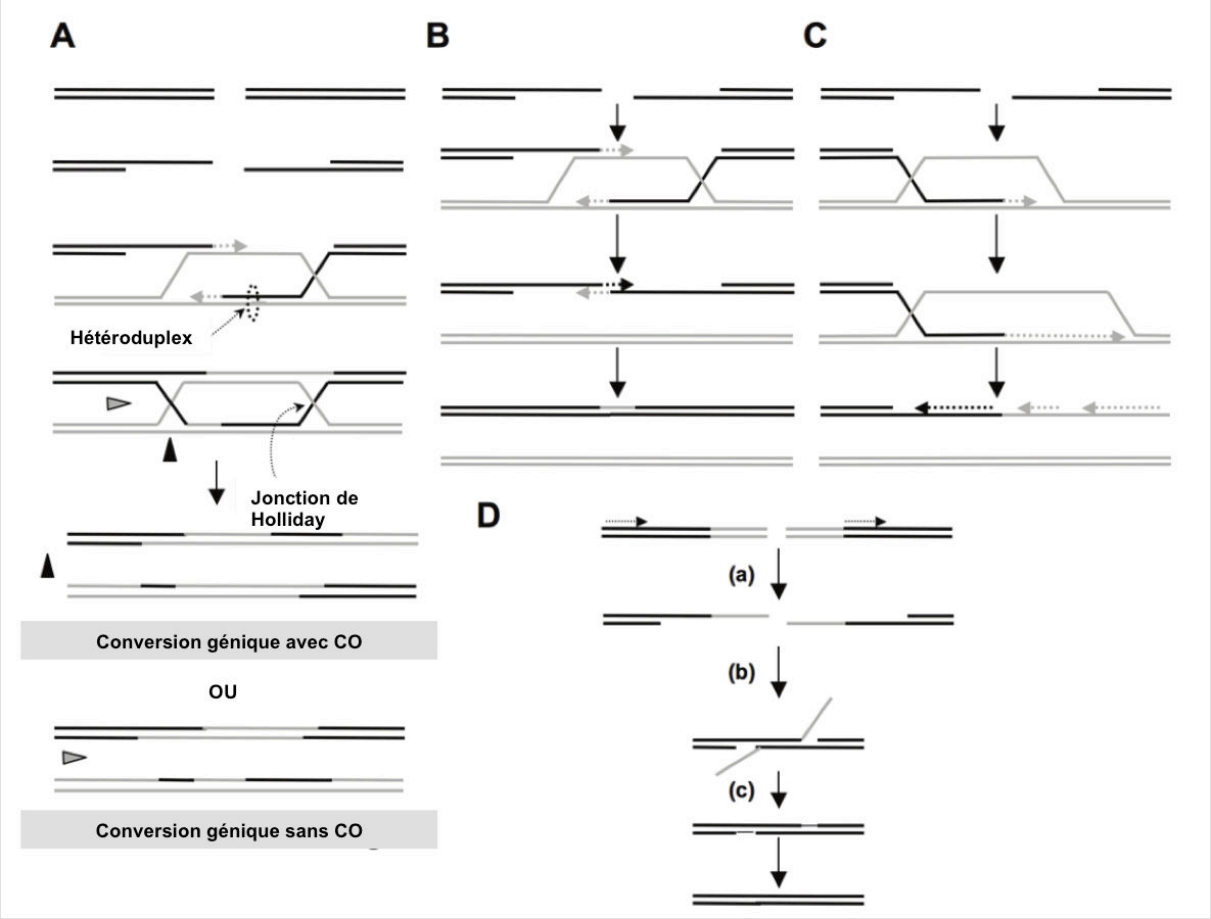


Figure 2 : Recombinaison homologue (RH)

(figure extraite de Grabarz, Barascu, Guirouilh-Barbat & Lopez, 2012).

A) Modèle de réparation des CDB. La résection simple brin génère des extrémités 3' sortantes qui envahissent le double brin d'ADN homologue formant une D-loop (displacement-loop). La synthèse d'ADN est initiée à partir de l'extrémité 3' envahissante. La D-loop s'hybride avec l'autre ADN simple brin. La synthèse d'ADN permet la réparation de la CDB. Des jonctions cruciformes, appelées jonctions de Holliday sont formées. La résolution de ces jonctions peut se faire suivant deux orientations (flèche noire ou grise) amenant à une conversion génique avec ou sans crossing over (CO).

B) Appariement dépendant de la synthèse (Synthesis-dependent strand annealing, **SDSA**). L'initiation est similaire au modèle précédant, avec la résection simple brin, l'invasion du double-brin homologue et synthèse d'ADN mais le brin le brin invasif se dé-hybride et s'apparie avec l'autre brin de la molécule endommagée : aucune jonction de Holliday n'est formée. Ce modèle amène donc à une conversion génique sans CO.

C) réplication induite par une CDB (Break-induced replication, **BIR**). L'initiation est similaire au modèle précédant, avec la résection simple brin, l'invasion du double-brin homologue et synthèse d'ADN, mais la synthèse continue sur une longue distance le long des bras du chromosome pouvant même atteindre la fin du chromosome. Aucune jonction de Holliday ou de CO n'est formé.

D) Appariement de simple brin (Single-strand annealing, **SSA**). (a) Une CDB est produite entre deux séquences homologues en tandem, dans la même orientation (flèches noires) (b) La résection simple brin révèle les deux séquences complémentaires qui peuvent alors s'hybrider (c) La résolution de ces intermédiaires entraine la délétion des séquences intermédiaires aux deux séquences les répétitions initiales. Contrairement aux autres mécanismes, le SSA ne nécéssite pas d'invasion de brin, il est donc indépendant de RAD51.

2. Le C-NHEJ

Le C-NHEJ se déroule en sept étapes : (1) la reconnaissance de la cassure par le complexe Ku, (2) l'assemblage et la stabilisation du complexe DNA-PK, (3) le rapprochement des extrémités et leur stabilisation, (4) l'activation de l'activité kinase de DNA-PK (5) la maturation des extrémités de la CDB (si nécessaire), (6) la ligature des extrémités par le complexe XRCC4/Ligase IV et (7) la dissociation du complexe (figure 3). Le C-NHEJ permet la conservation de l'information génique mais également sa diversité dans les mécanismes de V(D)J et de CSR (Bétermier, Bertrand & Lopez, 2014).

i. Détection de la cassure : Le complexe Ku

Le complexe Ku est le premier à se fixer au niveau de la cassure, il protège ainsi les extrémités double-brin et forme une « plate-forme » d'accessibilité aux autres composants du C-NHEJ puisqu'il a la capacité de se lier à chacun d'entres eux (Costantini et al., 2007, Yano et al., 2008, Mari et al., 2006, Davis & Chen, 2013). L' hétérodimérisation des sous-unités **Ku70 et Ku80** forme une structure en « anneau » permettant de se fixer à environ 20 pb d'ADN (Walker et al., 2001). Cette fixation se fait indépendamment de la séquence d'ADN, Ku se liant au niveau des sucres des nucléotides. Chaque sous-unité possède un domaine *core* extrêmement conservé (depuis l'ancêtre procaryote) permettant la liaison du complexe à l'ADN (Doherty et al., 2001). De part son abondance nucléaire et sa haute affinité par pour l'ADN double-brin, Ku est un excellent senseur de CDB (Mimori & Hardin, 1986, Postow, 2011). En plus de son activité dans la réparation des CDB, Ku participe à la transcription de certains gènes et à la maintenance des séquences télomériques, rendant son inactivation impossible dans les cellules humaines (Song et al., 2000, Grundy et al., 2014, Wang et al., 2009).

ii. Le complexe DNA-PK

La sous-unité catalytique de la DNA-PK i.e **DNA-PKcs**, interagit avec les douze derniers acides-aminés de Ku80 formant ainsi le complexe DNA-PK (Gell & Jackson, 1999) (Singleton et al., 1999). Ce complexe se met en place quelques secondes après l'induction de CDB. Bien qu'ayant elle-même un domaine d'interaction à l'ADN, ce recrutement par l'intermédiaire de Ku80 et de l'ADN permet d'amplifier d'environ 100 fois son accumulation au niveau d'une CDB (Gottlieb & Jackson, 1993, Lees-Miller et al., 1995, Suwa et al., 1994). Ce complexe ADN/DNA-PK permet la **stabilité** des extrémités d'ADN, tout au long du cycle cellulaire, par la formation d'une **synapse** permettant leur rapprochement et inhibe l'action des nucléase ou de ligase (Cary et al., 1997, Weterings & Van Gent, 2004, Shao et al., 2012). Le recrutement de DNA-PKcs via Ku permet l'activation de son activité kinase vraisemblablement par un changement de conformation (Rivera-Calzada et al., 2005, Spagnolo et al., 2006). Même si ce mécanisme n'a pas été totalement élucidé, l'interaction avec l'ADN est crucial à l'activation de DNA-PK (Hammarsten & Chu, 1998, West et al., 1998).

L'activité kinase de DNA-PK permet la phosphorylation d'un grand nombre de cibles : le complexe Ku, XRCC4, DNA-Ligase IV et XLF mais aucune de ces phosphorylations n'est indispensable au bon déroulement du NHEJ (Lebe et al., 1998, Douglas et al., 2005, Kurimasa et al., 1999). De même, la phosphorylation par DNA-PK d'Artémis, p53 et H2AX n'est pas réellement indispensable car redondante de celle effectuée par ATM**.** Cependant, d'autres cibles ont été trouvées (AKT1 et HSP90 par exemple). Leur implication exacte dans la réparation des CDB reste à élucider (Solier et al., 2012, Toulany et al., 2012)**.** Très récemment un rôle clé du complexe DNA-PK a été décrit dans la réorganisation de l'appareil de Golgi suite à un dommage. Ce rôle cytoplasmique du complexe est essentiel à la survie cellulaire après dommage (Farber-Katz et al., 2014, Foiani & Bartek, 2014). Le rôle de DNA-PKcs dans le NHEJ réside dans sa propre phosphorylation (Doug W Chan et al., 2002).

DNA-PKcs est phosphorylée et/ou auto-phosphorylée sur de nombreux sites (pour revue (Davis et al., 2014)). L'autophosphorylation de **DNA-PK** sur la thréonine 2609 (Thr2609) est la mieux caractérisée : *in vitro* elle permet son inactivation par sa dissociation du complexe ADN/Ku (Chan & Lees-Miller, 1996, Merkle et al., 2002). La **Thr2609** est également une cible de l'activité kinase d'ATM et ATR (B. P. C. Chen et al., 2007, Yajima et al., 2006). Celle-ci a un rôle majeure dans le NHEJ : une substitution par une alanine réduit son efficacité *in vitro* et engendre une sévère radiosensibilité (Reddy et al., 2004, Nagasawa et al., 2011). De plus, chez la souris, une mutation sur cette thréonine mène à une mortalité précoce et un déficit immunitaire congénital du à une V(D)J non fonctionnelle (S. Zhang et al., 2011)**.** Cette phosphorylation est indispensable au recrutement de l'enzyme Artémis (Goodarzi et al., 2006).

iii. Maturation des extrémités : Artémis, polymérases X, TdT et autres facteurs

Les CDB à extrémités franches peuvent être directement ligaturées par le complexe core (Ku/DNA-PKcs/XRCC4/LigIV) du C-NHEJ. Les CDB engendrées par des radiations ionisantes ou des ROS produisent des extrémités 5' ou 3' sortantes ou avec des groupements ne pouvant être directement prises en charge par la ligase IV. Les extrémités doivent être maturées par résection, polymérisation ou excision.

Une des protéines impliquées dans la résection des extrémités d'ADN est **Artémis** : elle possède une activité 5' endonucléase capable de générer des extrémités « propres » à partir d'une extrémité 5' sortante et de nombreuses autres structures dont les extrémités « en épingle à cheveux » (Ma, Schwarz & Lieber, 2005). L'activité endonucléase d'Artémis permet donc le clivage des extrémités générées par RAG au niveau du joint codant dans la V(D)J (Goodarzi et al., 2006, B.-S. Lee et al., 2013). Les autres enzymes pouvant effectuer la résection sont la Metnase, WRN (une hélicase de la famille RecQ) et APLF (aprataxin and PNKP-like factor). Leur activité *in vivo* est soit controversée (WRN et APLF) soit très minoritaire comparée à celle d'Artémis (Metnase) (Beck et al., 2011, Cooper et al., 2000, Kanno et al., 2007).

L'addition nucléotidique est effectuée par des polymérases (Pol) de la famille X ; **Polμ, Pol λ** et par la **TdT** (terminal deoxynucleotidyl transferase). Ces polymérases ne possédant pas d'activité de « relecture » 3'→5' sont dites «error-prone » ou infidèles (Yamtich & Sweasy, 2010). La TdT est uniquement exprimée au cours du développement précoce des lymphocytes B et T au moment de la recombinaison V(D)J, elle permet l'ajout de

nucléotides indépendamment de la présence d'un brin matrice au niveau du coding joint : on parle de « N-additions » (Non templated) (Desiderio et al., 1984, Benedict et al., 2000). Une surexpression de la TdT permet l'ajout de nucléotides aux extrémités de CDB non issues de l'action de RAG au sein de cellules non B, dans des régions non codantes. Cependant, cet ajout est dépendant de la présence de Ku et XRCC4, démontrant que l'action de la TdT est uniquement contrôlée par son expression et par la présence des facteurs du C-NHEJ (Boubakour-Azzouz et al., 2012).

Les extrémités 3' avec un groupement phosphate (3'P) ou 5' avec un groupement hydroxyle (5'P) ne peuvent être liguées. La **PNKP** (polynucleotide kinase/phosphatase) peuvent les ôter et restaurer des extrémités 3'OH et 5'P pouvant être prise en charge par la ligase IV (Bernstein et al., 2005). De même, **l'Apraxin** restaure une extrémité 5'P en clivant un groupement adénylate lié de manière covalente à celui-ci (Ahel et al., 2006). Ku est également impliqué dans la maturation des extrémités : son activité 5' deoxyribose-5-phosphate (5'-dRP)/AP lyase lui confère la capacité d'exciser les sites abasiques proches de la CDB (Roberts et al., 2010).

iv. Ligature des extrémités : XRCC4, l'ADN ligase IV et Cernunnos

La ligature des extrémités est effectuée par l'ADN ligase IV (Lig4). L'activité de celle-ci est fortement stimulée par XRCC4 (X-ray cross complementing protein 4) qui permet sa stabilisation et son adénylation par l'ATP (Grawunder et al., 1997). L'hétérodimère **XRCC4/Lig4** est recruté via l'interaction entre Ku et un domaine BRCT de Lig4 (Costantini et al., 2007). L'activité du complexe est stimulée par **APLF** et **Cernunnos** (Buck et al., 2006, Ahnesorg et al., 2006). APLF est une protéine accessoire du NHEJ, sa perte conduisant à seulement une diminution de celui-ci (Grundy et al., 2013, Iles et al., 2007). Elle permettrait la stimulation de la ligation via la stabilisation du complexe XRCC4-Lig4/Ku au site de la CDB. Le facteur **Cernunnos ou XLF** (XRCC4-like factor) interagit avec XRCC4 et promeut l'adénylation de la Lig4. De plus, il forme avec XRCC4, un « filament » qui permettrait potentiellement de relier les complexes DNA-PK situés aux deux extrémités de la cassure, on parle de « end-bridging » (Ropars et al., 2011, pour revue sur la conformation : Ochi, Wu, & Blundell, 2014). Il est également indispensable à l'alignement des séquences prélude à l'action de Polμ et Pol λ sur les extrémités cohésives 5' ou 3' sortantes (Akopiants et al., 2009).

v. Dissociation du complexe NHEJ

La dissociation du complexe est effectuée via la polyubiquitination de Ku80 par l'E3 ligase **SCF** (Skp1-Cul1-F box) et **RNF8** sur la lysine 48. Cette modification permet l'hydrolyse du complexe Ku et sa prise en charge par le protéasome (Postow et al., 2008, Postow, 2011, Postow & Funabiki, 2013).

3. Le NHEJ alternatif : l'A-EJ

Une activité résiduelle de ligature des extrémités de CDB fut la première fois rapportée en 1996 au sein de mutants Ku70, Ku80 ou Lig4 de S. *cerevisae*. (S. J. Boulton, 1996, S. J. Boulton & Jackson, 1996). Cette religature indépendante des protéines clés du C-

NHEJ est caractérisée par des délétions et une utilisation accrue des séquences d'homologie aux jonctions. L'A-EJ fut également trouvé chez la plupart des eucaryotes supérieurs (*Arabidopsis, C. Elegans, Xenopus…*) (Heacock et al., 2004, Pontier & Tijsterman, 2009) et au sein de fibroblastes et de cellules B de mammifères déficientes ou mutantes pour la LIG4, KU ou XRCC4 (Kabotyanski et al., 1998, Liang et al., 1996, Verkaik et al., 2002, Guirouilh-Barbat et al., 2004). Ce mécanisme alternatif de ligature des extrémités fut nommé Microhomology (MH) -mediated end joining (**MMEJ**). Mais les jonctions de la réparation en absence du C-NHEJ ne présentant pas toujours de MH et le C-NHEJ pouvant mener à une réparation avec MH, la dénomination alternatif NHEJ ou A-EJ est plus correcte (Lieber, 2010, Boboila et al., 2012, Grabarz et al., 2012, Deriano & Roth, 2013). L'A-EJ diffère du SSA car il est indépendant de RAD52 et utilise des séquences d'homologie bien plus petites (entre 4 et 20 pb) (Guirouilh-Barbat et al., 2004, J.-L. Ma et al., 2003, Bennardo et al., 2008, Decottignies, 2013). L'ensemble des acteurs impliqués dans la détection de la cassure, la résection, la maturation et la ligature des extrémités lors de l'A-EJ reste à caractériser (Revue : (Frit et al., 2014), figure 3).

i. Détection de la cassure : PARP1

Le rôle senseur de **PARP1** dans la réparation des cassures simple brin est bien établi. Il promeut leur réparation *via* le recrutement des plusieurs protéines dont le facteur **XRCC1** et la ligase III (Revue : Caldecott, 2008). Plusieurs études ont également établi que PARP1 joue le rôle de senseur des cassures double brin dans l'A-EJ. Une des études a démontré que les cellules DNA-PK déficientes traitées avec un inhibiteur de PARP étaient très sensibles aux radiomimétiques, n'ayant aucun moyen de restaurer l'intégrité de l'ADN en dehors des phases réplicative et G2 (M. Wang et al., 2006, Audebert et al., 2004). De plus, l'étude des jonctions switch dans des cellules B déficientes en PARP1 a démontrée une utilisation réduite des MHs (Robert et al., 2009). Pour finir, les fusions télomériques résultant d'une activité de end-joining sont réduites en l'absence simultanée de Ku et PARP1 (Sfeir & de Lange, 2012). A l'instar de KU pour le C-NHEJ, PARP1 servirait de plate-forme pour le recrutement de XRCC1, Lig3, PNK et MRN (Audebert et al., 2004, Audebert et al., 2006, Cheng et al., 2011). **MRE11** pouvant permettre le rapprochement des extrémités (Williams et al., 2008).

ii. Résection : MRN/CtIP

L'étape de résection est initiée par MRN et CtIP (Truong et al., 2013, Grabarz et al., 2012, Huertas, 2010). Chez *S. cerevisae,* MRE11 et Rad50 sont essentiels pour la réparation par MHs (J.-L. Ma et al., 2003, K. Lee & Lee, 2007). Chez les mammifères, dans un mutant RAG2 permissif pour l'A-EJ, **NBS1** a un rôle crucial dans la formation du coding-joint en absence d'Artémis et de DNA-PKcs (Deriano et al., 2009). L'utilisation de substrats intrachromosomiques (génération enzymatique de CDB) a également démontré l'implication de **MRE11** dans l'A-EJ dans les cellules humaines et murines (Rass et al., 2009, Xie et al., 2009). L'inhibition de CtIP par siARNA affecte le NHEJ dans les DT40 et les HEK (Yun & Hiom, 2009, Bennardo et al., 2008) et la réparation des CDB en G1 est affectée dans les mutants CtIP (Yun & Hiom, 2009). Aucune implication d'EXO1 n'a pour l'instant été décrite dans l'A-EJ. Une résection de 50 pb étant suffisante à l'action de l'A-EJ, il a été supposé que l'extension de la résection n'était pas indispensable. Cependant, des évènements d'A-EJ avec

de très grandes délétions (>200 pb) ont été observés en absence de RIF1 (voir article 1 et Grabarz et al., 2013a). Il serait intéressant de voir si ces évènements ne dépendent pas de l'activité d'autres nucléases. De manière surprenante, BLM qui promeut la résection en G2, possède de part son interaction avec 53BP1 en G1, une activité inhibitrice de la résection conduisant à de l'A-EJ (Grabarz et al., 2013).

iii. Maturation des extrémités

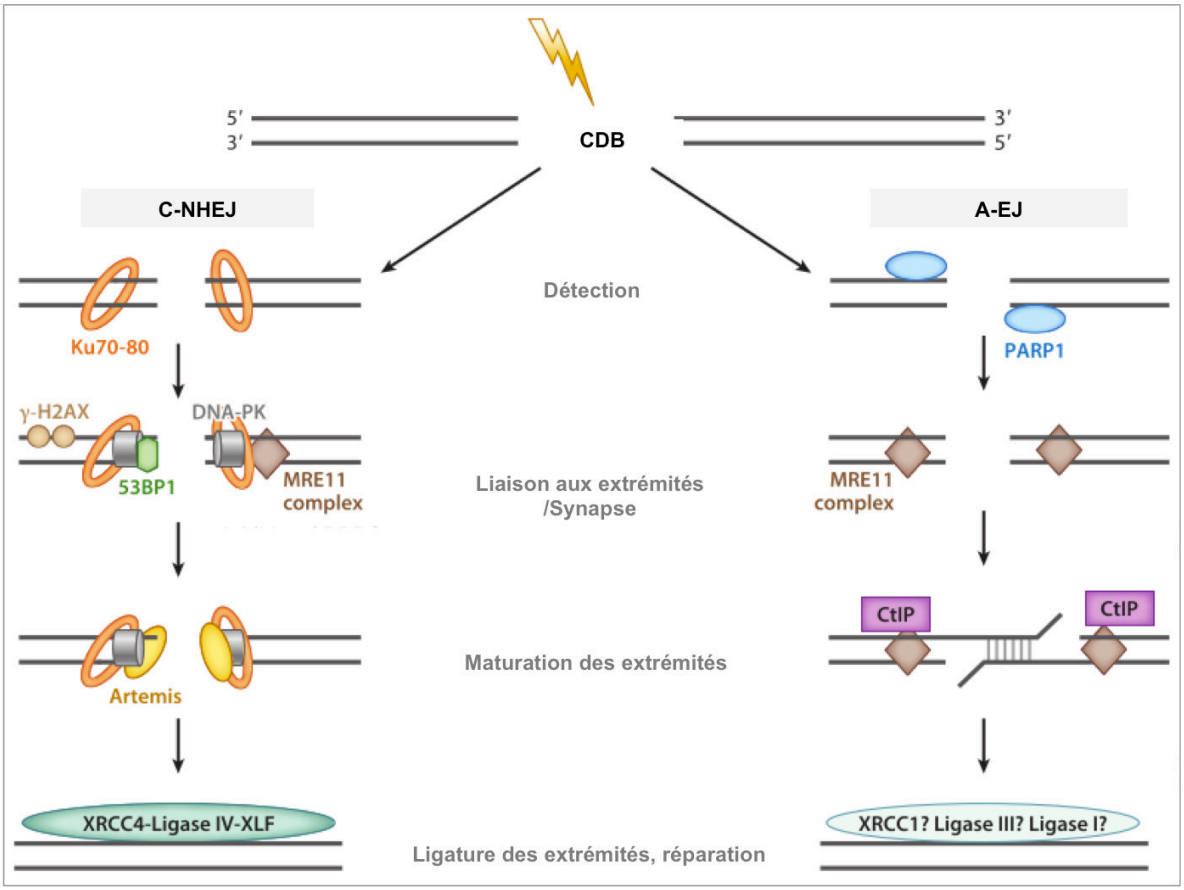
Les protéines impliquées dans la recherche de séquences d'homologie, leur appariement, l'éventuelle polymérisation et le clivage des extrémités simple brin sortantes ne sont pas connues. Ici sont répertoriées de potentiels acteurs de ces mécanismes.

Chez la levure, plusieurs polymérases ont été proposées comme actrices du A-EJ (Huertas, 2010). Chez *D. melanogaster* et *C. elegans*, **Polθ** (PolQ) interviendrait dans l'A-EJ (S. H. Chan, Yu, & McVey, 2010, Roerink et al., 2014, Koole et al., 2014). Récemment, une étude a montré que les jonctions issues de la CSR de souris *FancA* présentaient moins de petites MH et plus d'insertion, ce même résultat a été trouvé avec un substrat intrachromosomique dans les cellules humaines, suggérant un rôle de la protéine **FANCA** dans la stabilisation des duplexes contenant de petites MH (Nguyen et al., 2014). Les protéines Rad1 et Rad10 pourraient également être nécessaires à l'excision de l'extrémité 3'sortante (3' Flap) suite à l'appariement de séquences d'homologie (J.-L. Ma et al., 2003). L'intervention de **ERCC1-XPF**, homologues de Rad1 et Rad10 chez les mammifères, dans l'A-EJ est également décrite (Ahmad et al., 2008). De part son activité endonucléase et par son interaction avec des polymérases, **FEN1** (endonucléase Flap 1) a été également proposé comme acteur du A-EJ (Göttlich et al., 1998; Liang et al., 2005; Tseng & Tomkinson, 2004). La **PNK** (polynucleotide kinase) serait également nécessaire au « nettoyage » des extrémités prélude à leur ligature. Elle interagit avec XRCC1, est co-recrutée avec PARP1 et le complexe XRCC1/Lig3 et la ligature d'extrémités 5'OH est compromise in vitro en son absence (Audebert et al., 2006).

iv. Ligature des extrémités : XRCC1 et l'ADN Ligase III

Plusieurs études avec des substrat de réparation plasmidiques et des études biochimiques ont démontré que la ligature des extrémités résultant d'une prise en charge par l'A-EJ était effectuée par le complexe **XRCC1/LIG3** (Audebert et al., 2004, H. Wang et al., 2005, Liang et al., 2008, Cotner-Gohara et al., 2010, Simsek et al., 2011). Cette ligature est stimulée par le complexe MRN (Della-Maria et al., 2011)**.** XRCC1 stabilise la Ligase 3, et participerait donc à cette étape de ligature (Caldecott, 2003, Della-Maria et al., 2011). Cependant, XRCC1 ne semble pas requis pour la CSR, son inhibition dans des cellules B lig4-/- n'affectant ni le NHEJ aux jonctions switch ni le taux d'utilisation des MH (Boboila et al., 2012, Han et al., 2012). La **ligase 1** pourrait également intervenir dans l'A-EJ : son activité est détectée dans les cellules DT40 déficientes pour la LIG4 et la LIG3, elle agirait en absence de la LIG3 dans l'A-EJ (Paul et al., 2013).
Chacun des facteurs connus comme impliqués dans l'A-EJ (XRCC1, LIG3, PARP1, MRE11 et CtIP) ont des rôles dans d'autres mécanismes de réparation (BER, NER ou RH) (Boboila, Alt, et al., 2012). Ainsi, l'A-EJ n'est peut-être pas un mécanisme de réparation à proprement

parlé mais reflèterait plus l'action de plusieurs mécanismes compensant une perte du C-NHEJ.



<u>Figure 3</u> : Réparation d'une cassure double brin (CDB) par C-NHEJ ou A-EJ.

Figure extraite de (Deriano & Roth, 2013). Voir texte.

C. Importance du NHEJ dans la diversité génétique

Le rôle majeur du EJ dans la diversité du génome est reflété par son importance dans les mécanismes permettant la création d'un répertoire immunitaire extrémement varié : La recombinaison V(D)J et La commutation de classe (CSR). Acteurs du système immunitaire adaptatif, les lymphocytes B circulants doivent être capables de reconnaître la grande variété d'antigènes. Ceci est rendu possible grâce à la diversité du répertoire des immunoglobulines (Igs) i.e BCR (B cell receptor) sous forme membranaire et les anticorps (Ac) sous forme soluble. Ce récepteur est formé de deux chaînes lourdes (H pour Heavy) codées par les gènes du locus IgH et deux chaînes légères (L pour Light) codées par les loci IgLκ ou IgLλ. Ces chaînes sont liées entre elles de manière covalente par des ponts disulfures. Chacune de ces quatre chaînes possède une **région variable V** (extrémité N-terminale) qui est le **site de liaison à l'antigène**, et une région constante C (extrémité C-terminale) (Figure 4). La région variable de la chaîne lourde régit l'isotype du récepteur, de la nature de celui-ci dépend sa fonction effectrice. Au cours de la maturation lymphocytaire B, les gènes des immunoglobulines vont subir plusieurs réarrangements impliquant la génération enzymatique de CDB et leur prise en charge par le NHEJ. En raison du très fort potentiel mutagène des enzymes RAG et AID qui génèrent les CDB, leur action est finement régulée et restreinte à un moment précis du développement lymphocytaire.

1. Lymphocytes B, recombinaison V(D)J et le complexe RAG

Au sein des cellules pro-B de la moelle osseuse, les gènes codants **la région variable** de la chaine lourde et de la chaine légère sont sujets à une recombinaison somatique : la recombinaison V(D)J. Elle permet l'assemblage de plusieurs segments géniques de variabilité (V), de diversité (D) et de jonctions (J) pour aboutir à la formation d'un seul fragment V(D)J codant. Ce processus est initié par la génération de CDB par **l'endonucléase RAG** (recombination activating gene) au niveau de séquences **RSS** (Recombination signal sequences) qui bordent chaque gène V, D ou J. La ligatures des extrémités d'ADN générées est prise en charge par le NHEJ et aboutie à la formation de deux segments ; le segment intrachromosomique codant (coding joint) et un fragment exclu non codant (signal joint). La grande diversité des BCR vient (1) de la recombinaison aléatoire entre les segments V, D et J pour la formation du coding joint (on parle de **diversité combinatoire**) et (2) de l'ajout de nucléotides par la TdT avant la religature des extrémités (**diversité jonctionnelle)** (Figures 4 et 5). La recombinaison se produit uniquement entre un gène dont la séquence RSS contient un espaceur de 23 bases d'ADN avec un gène dont la séquence RSS contient un espaceur de 12 bases d'ADN (appelée règle 12/23). De cette manière deux gènes possédant le même espaceur ne peuvent pas recombinés, évitant ainsi la recombinaison entre le gène J et le gène V des chaînes lourdes. Au cours de la recombinaison, plusieurs étapes permettent la sélection des cellules avec un récepteur fonctionnel, c'est à dire capable (1) d'interagir avec un antigène et (2) permettant la tolérance au soi (pas ou peu d'activité auto-réactive). Respectivement : la sélection positive et la sélection négative. Les gènes des chaînes constantes ne sont pas ciblés par le complexe RAG, le gène Cμ reste donc sous contrôle du promoteur et un épissage alternatif permet la co-expression du gène Cδ.

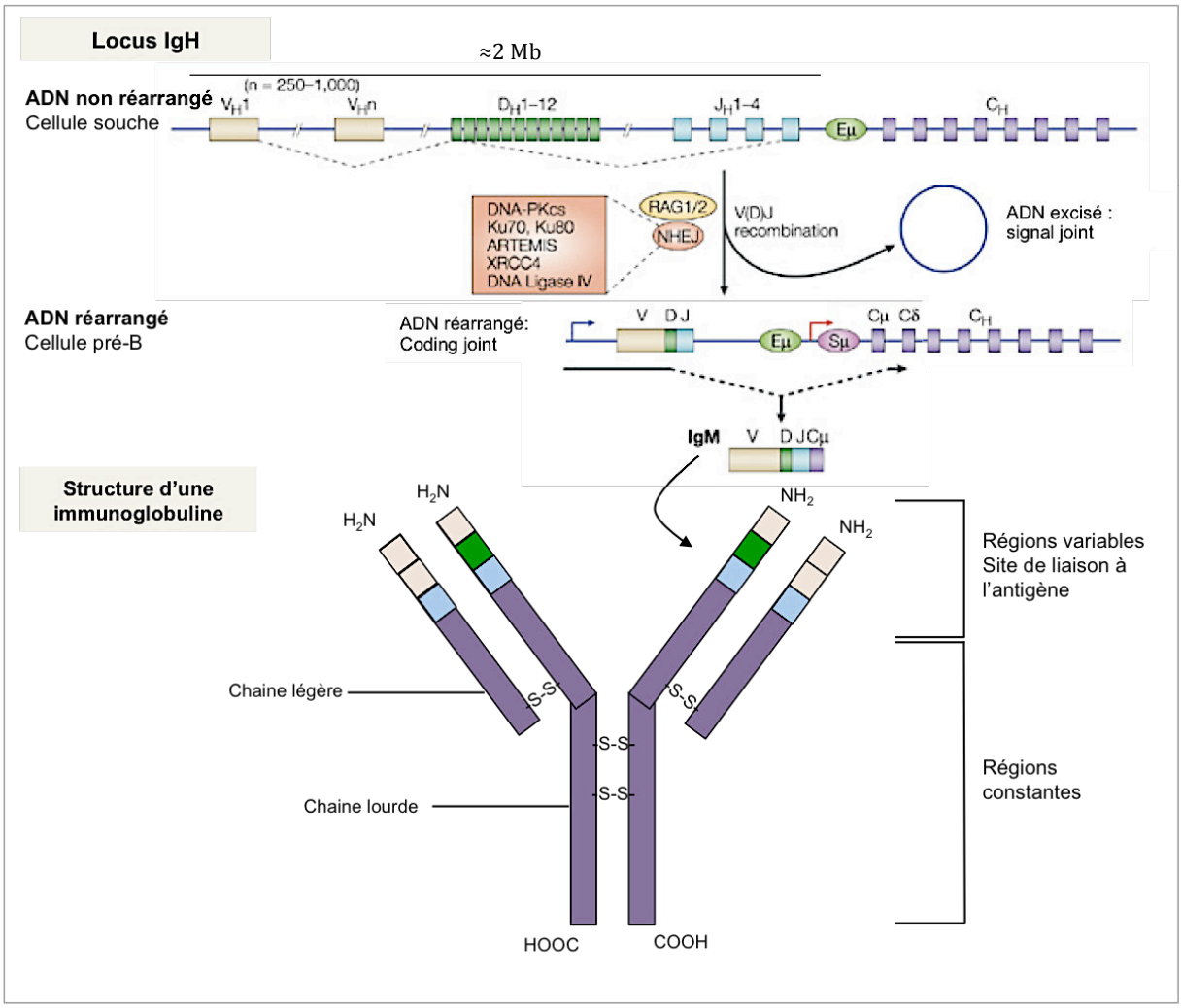


Figure 4 : Réarrangement du locus IgH et structure du BCR fonctionnel.

Schéma modifié de (Chaudhuri & Alt, 2004).

Schéma du locus non réarrangé des gènes de la chaine lourde des Igs. Les segments de variabilité (V), de diversité (D) et de jonctions (J) sont respectivement représentés en beige, vert et bleu et ceux de la région constante (C) en violet. La taille approximative de la région variable et le nombre approximatif des différents segments sont indiqués. Les CDB effectuées par RAG et leur prise en charge par le NHEJ, permet la création d'un ADN codant réarrangé (coding joint) et d'un segment circulaire (signal joint). La cellule pré-B avec un réarrangement réussi des gènes de la chaine lourde effectue la recombinaison VJ des gènes des chaines légères (non représentées ici). La transcription suivie de la traduction des gènes réarrangés de la chaine H et des chaines L aboutira à la formation d'un BCR fonctionnel. La cellule B naïve (ou mature) sera alors apte à reconnaître un grand nombre d'antigènes.

Après la V(D)J, les lymphocytes B matures/naïfs sortant de la moelle osseuse possèdent donc un récepteur de type IgM et IgD capables d'interagir avec un grand nombre d'antigènes. Il est à noter que la recombinaison V(D)J est aussi un acteur de la diversification du récepteur des lymphocytes T (TCR) non décrite ici. Les cellules B et T matures forment le répertoire pré-immun (pour revues : (Boboila, Alt, & Schwer, 2012; Helmink & Sleckman, 2012)). Dans de rares cas, une réparation aberrante de ces CDB programmées peut aboutir à des translocations, des délétions et des inversions. Ces évènements sont d'autant plus dangereux s'ils se déroulent à proximité d'un gène suppresseur de tumeur ou d'un oncogène, leur translocation pouvant mener à une transformation cellulaire prélude aux tumeurs lymphoïdes. C'est le cas de la translocation t(14 ;18) : le gène *BCL2*, cible non spécifique de RAG, est placé sous promoteur des gènes IgH. La surexpression de ce facteur anti-apoptotique mène à l'apparition de lymphomes. L'accessibilité de RAG à l'ADN, son activité enzymatique et sa dégradation sont ainsi finement régulées pour limiter le nombre de CDB et maintenir la stabilité génétique. L'endonucléase RAG est composée de deux sous unités **RAG1 et RAG2** situées sur le même locus génique *Rag*. L'expression de RAG étant directement reliée à l'efficacité de la recombinaison V(D)J et donc à la quantité de CDB générés, RAG1 et RAG2 sont exprimées uniquement aux stades très précoce du développement lymphocytaire (Oettinger, 1990). RAG1 possède l'activité nucléase et RAG2 faisant office de sous-unité régulatrice, le complexe entier RAG1/RAG2 est requis pour le clivage de l'ADN. Celui-ci se lie, avec un co-facteur protéique HMGB1 (high-mobility group protein), aux séquences **RSS** et génère une CSB, la formation d'une synapse permet le rapprochement de deux complexes RAG/RSS et les CSBs sont converties en CDB (Figure 5). Plusieurs facteurs contribuent à l'organisation 3D du locus IgH et au bon déroulement de la V(D)J, parmi eux le la protéine CTCF et le complexe de cohésion décrits dans un prochain chapitre (Degner et al., 2011). La stabilité du complexe RAG/RSS est régulée par la présence de H3K4me3 et l'interaction directe de RAG2, via son domaine PHD (plant homeo domain), avec celui-ci (Matthews et al., 2007). L'activité du complexe est inhibée par dégradation de RAG2 par phosphorylation à l'entrée en phase S du cycle cellulaire. La formation de CDB se limite donc à la phase G1, ce qui favorise la réparation par NHEJ (Li et al., 1996). De même, en phases S et G2, le locus *Rag* est repositionné au niveau de l'hétérochromatine péri-centromérique (PCH) afin d'inhiber la transcription des gènes *Rag*. Ce repositionnement actif se fait via la voie de signalisation de l'interleukine 7 (IL7) et de son médiateur phosph-STAT5 (Johnson et al., 2012). Dès qu'un réarrangement est productif, la génération de CDB doit cesser afin d'obtenir un seul type de chaîne légère et un seul type de chaîne lourde. Ceci est rendu possible par la surexpression de la protéine AKT par les cellules B ayant un BCR fonctionnel, engendrant la séquestration cytoplasmique des protéines FoxO, protéines permettant d'activer la transcription de RAG1 et RAG2 (Kuo & Schlissel, 2009, Schatz & Ji, 2011). **Le domaine C-terminal de RAG2** possède également un rôle majeur dans **le maintien la stabilité génétique** de la cellule T et B : il contrôle la stabilité du complexe RAG/DNA post-clivage et inhibe (1) la résection des extrémités menant à une réparation délétère par le NHEJ alternatif (A-EJ) (Corneo et al., 2007) (2) la génération d'autres CDB et le rapprochement d'extrémités issues de deux *loci* différents prélude aux réarrangements

aberrants et à la lymphomagénèse (Deriano et al., 2011, Chaumeil et al., 2013). L'A-EJ et la mobilité des CDB seront abordés plus loin.

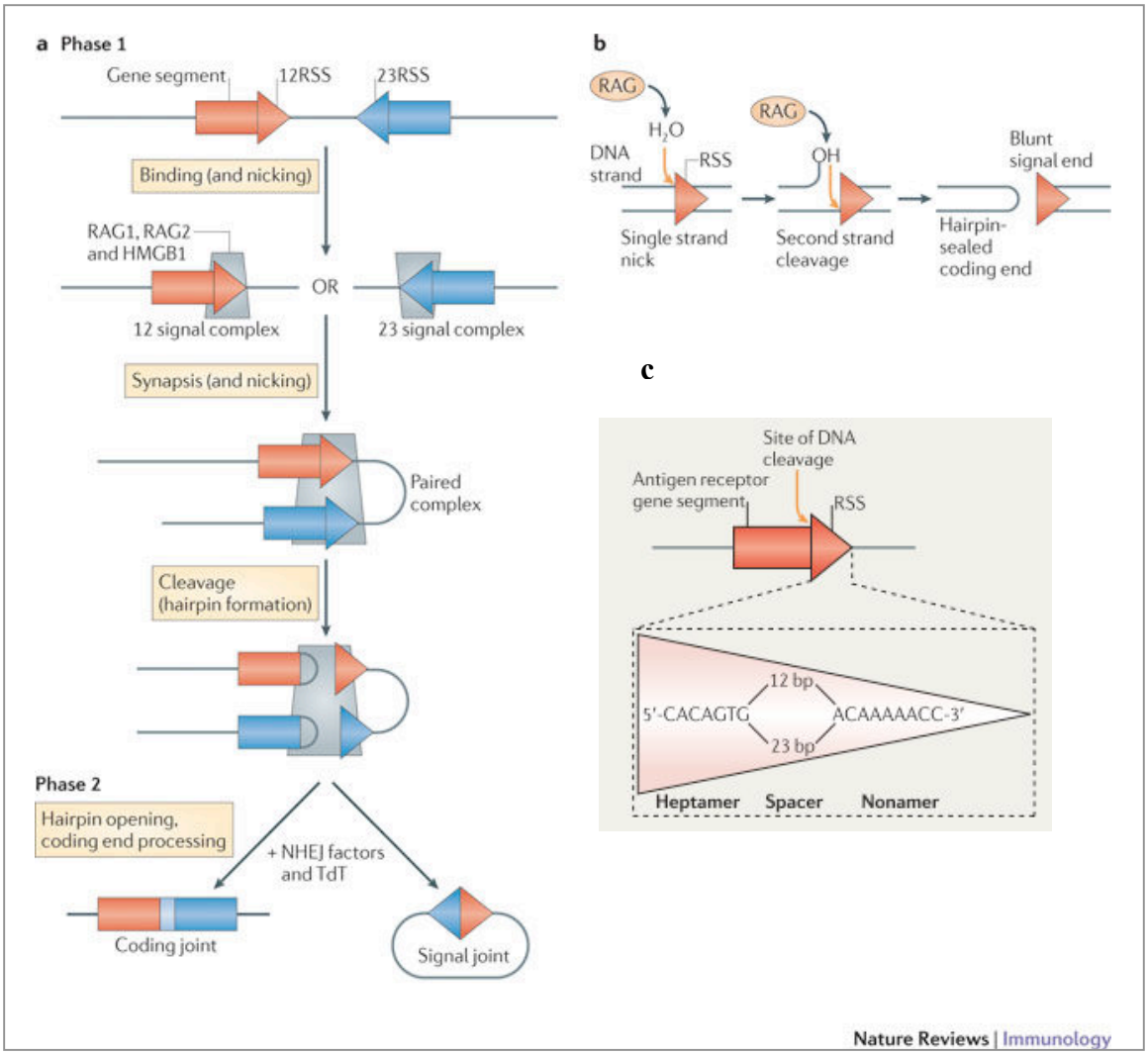


Figure 5 : Mécanisme de la recombinaison V(D)J, coupure enzymatique par le complexe RAG et schéma du séquence RSS. Figures tirées de l'article (Schatz & Ji, 2011).

(a) Etapes de la recombinaison V(D)J : Chaque segment génique V, D ou J est bordé d'une séquence RSS avec un espaceur de 12 ou de 23 pb (respectivement 12RSS et 23 RSS). Dans un premier temps, RAG1, RAG2 et HMGB1 se lient à ces séquences formant ainsi un complexe signal 12 ou un complexe signal 23. Une synapse permet l'appareillement de ces deux complexes et la formation d'un complexe appareillé (paired complex) au sein duquel RAG va introduire une CDB. Dans un deuxième temps, le NHEJ prend en charge la religature des extrémités générées formant ainsi un segment codant (coding joint) et non codant (signal joint). La polymérase TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) peut introduire des nucléotides au moment de la ligature du coding joint, générant ainsi de la diversité jonctionnelle (rectangle bleu clair).

(b) Etapes du clivage par RAG. RAG introduit une CSB entre la séquence RSS et le segment génique en catalysant l'hydrolyse du pont phosphodiester. Le groupement hydroxyle (OH) libéré va alors attaquer le brin opposé créant ainsi une CDB et générant une structure en épingle à cheveux (hairpin-sealed) au niveau du coding joint et une éxtrémité franche au niveau du signal joint.

(c) Schéma d'une séquence signal de recombinaison (RSS) : une séquence heptamérique est suivie d'un espaceur (spacer) de 12 ou 23 pb puis d'une séquence nonamérique.

Après la recombinaison V(D)J, les cellules B IgM+ dites matures ou naïves sont libérées dans la circulation où elles sont activées par la recontre avec des antigènes et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions lymphatiques ou les amygdales. C'est au sein des centres germinatifs formés (GC pour germinal centers) dans ces organes qu'elles prolifèrent et vont subir l'hypermutation somatique (SHM pour Somatic Hypermutation) et la commutation de classe (CSR pour Class Switch recombination). La CSR passant à nouveau par l'induction et de CDB et la réparation par NHEJ en phase G1. Elle permet la génération de nouveaux isotypes. La SHM permet d'améliorer l'affinité du site de reconnaissance à l'antigène par l'introduction de mutations dans les gènes codant la région variable des Igs. Ces mécanismes de l'immunité acquise aboutissent à la génération d'un répertoire d'anticorps extrêmement varié et de haute affinité à partir d'un matériel génétique limité.

2. Lymphocytes B matures, commutation de classe (CSR) et AID

La CSR et la SHM requièrent l'activité de l'enzyme **AID** (Activation induced cytidine deaminase) (Revy et al., 2000, Muramatsu et al., 2000). AID déamine les deoxycytidines (dCs) en deoxyuridines (dUs) et le mésappariement **dU:dG** généré est pris en charge par différents mécanismes de réparation permettant la création d'une CDB aux régions switch (S) dans le cas de la CSR et la génération de mutations dans la SHM (Figure 6).

Durant la SHM, des mutations sont introduites à un taux extrêmement élevé (de 10^{-2} à 10^{-3} par pb par cycle) dans la région variable des gènes Igh et Igλ/κ. (McKean et al., 1984**,** Papavasiliou & Schatz, 2002**,** Peled et al., 2008). AID désaminant préférentiellement les bases RGYW/WRCY, les mutations sont surtout observées au niveau de ces motifs (appelés « hot spot ») (Rogozin & Diaz, 2004). La SHM requiert la transcription des exons de la région variable et l'interaction d'AID avec la protéine RPA, senseur de l'ADN simple brin (replication protein A) (Chaudhuri, Khuong, & Alt, 2004). Elle se déroule entre 100 et 200 pb après leur promoteur jusqu'à 1,5 et 2 kb en aval (Winter, Sattar, Mai, & Gearhart, 1997)**.** Dans un modèle simplifié de la SHM, la transcription des exons de la région variable permet le recrutement d'AID. La réplication des dUs engendre l'introduction de transitions (G:C vers A:T). Les mutations peuvent également être introduites via l'action de la protéine UNG (uraciles N glycosylase) du **BER** qui crée un site abasique et l'action de polymérases translésionnelles (**TLS**) dites « error-prone » permet l'introduction de mutations de transition et de transversion (Petersen-Mahrt, Harris, & Neuberger, 2002). Un dernier mécanisme passe par la reconnaissance du dU:dG par les protéines du **MMR** et le recrutement de la polymérase TLS eta (η). Ce dernier mécanisme est à l'origine de mutations sur les résidus A:T et/ou d'insertions et délétions au sein de la région variable (Peled et al., 2008, Petersen-Mahrt, Harris, & Neuberger, 2002). La SHM aboutit à la sélection des cellules B ayant un récepteur avec la plus grande affinité pour l'antigène rencontré. (Pour revues : Reynaud et al., 2009, Reynaud, et al., 2007) .

La CSR permet l'échange de l'exon Cμ de la région constante contre un autre exon (C_h) en aval (Cγ, Cε ou Cα) permettant l'expression d'un anticorps secondaire d'un autre **isotype** (IgG, IgE ou IgA respectivement). Ces isotypes ont des fonctions effectrices particulières durant la réponse immunitaire (Honjo, Kinoshita, & Muramatsu, 2002). La CSR est une recombinaison délétère qui se déroule entre des séquences répétées riche en dGs nommées régions « switch » ou régions S situées en amont de chaque gène C_h.

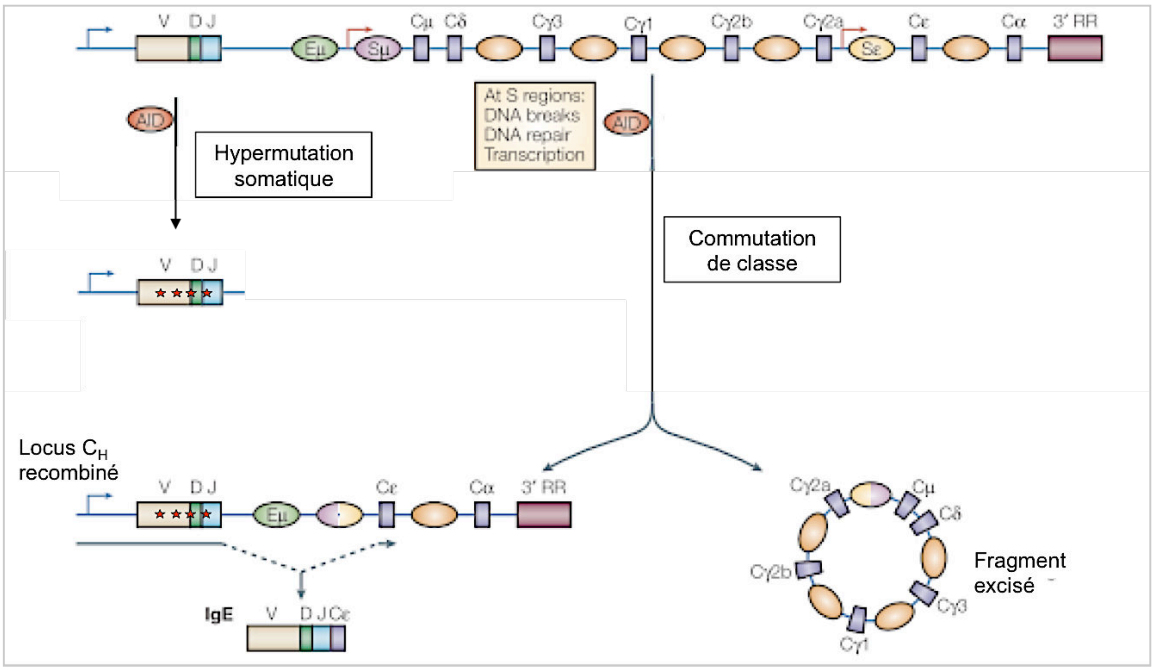


Figure 6 : Réarrangement du locus *IgH* : Hypermutation somatique (SHM) et Commutation de classe (CSR).

A gauche, SHM | La région variable du locus *IgH* (segments V,D et J) qui fut soumise à la recombinaison V(D)J va être la cible de la cytidine deaminase AID (en rouge). Différents mécanismes de réparation impliquant l'intervention de polymérases TLS vont prendre en charge les uraciles afin de générer des mutations (étoiles rouges) et donc de la diversité.

A droite, CSR | AID va également permettre la création de CDB au sein de loci spécifiques, les régions switch (S) (ovales) séparées de 60 à 200 kb et qui précèdant les gènes de la région constante (rectangles violets). Le locus *Igh* contient 8 gènes C_h tous précédé par une région switch de 1 à 12 kb. La région S du gène μ (Sμ) est représentée en violet et les autres en orange. Les CDB vont être prise en charge par le NHEJ engendrant la recombinaison entre deux régions switch : Sμ et une des gènes en aval (ici est représentée la recombinaison entre Sμ et Sε). Cette recombinaison engendre le réarrangement du locus constant de la chaîne lourde des IgH et la perte d'une séquence excisée : un fragment circulaire épisomal. Ainsi, un nouvel isotype sera exprimé (ici IgE). Les cytokines stimulent la transcription (flèche rouge) des gènes de la région constante de la chaîne lourde et détermine l'isotype que la CSR doit engendrer. La région 3′ RR (rectangle rouge) est cruciale pour la CSR.

La CSR nécessite également l'action d'AID durant la transcription des régions S, plus spécifiquement la formation de « bloucles-R ou R-loop » (Figure 7a) (Snapper et al, 1988). La prise en charge des dUs par le BER et MMR permet l'introduction de CDB. Le NHEJ permet de ligaturer les CDB entre deux régions S et l'excision de la région interne. Le nouveau gène C_h ainsi juxtaposé aux exons de la région variable réarrangée, permet l'expression d'une nouvelle Ig avec la même affinité pour l'antigène mais une nouvelle fonction effectrice (Boboila, Alt, et al., 2012).

AID est l'enzyme clé de la SHM et de la CSR. A l'instar de RAG, elle est uniquement exprimée à un stade très précis du développement lymphocytaire B (Revue : Matthews zheng diMenna et Chaudhuri 2014). Le recrutement d'AID aux séquences S se fait via l'ARN polymérase PolII, des modifications d'histones et la génération d'hybrides ADN:ARN (Pavri & Nussenzweig, 2011**,** Jeevan-Raj et al., 2011, Chaudhuri et al., 2007).

Lors de la CSR, les dUs sont pris en charge par différentes protéines des systèmes de réparation MMR et BER afin de générer des CDB (Petersen-Mahrt et al., 2002). La voie du BER impliquant les protéines **UNG et APE1** est décrite dans la Figure 7b. La reconnaissance du mésappariement dU:dG par complexe **MutSα** du MMR (hétérodimère MSH2/MSH6) permet également la création de nicks par recrutement de l'endonucléase PMS2/MLH1 et de l'exonucléase EXO1 (Chaudhuri & Alt, 2004**)**. L'inactivation conjointe de UNG et MSH2 (ou MSH6) au sein des lymphocytes B abolit complètement la CSR (Rada et al., 2004, Shen 2006). Il semblerait que la création de CDB prélude à la CSR soit majoritairement du à l'action de UNG étant donné le faible taux de CSR en absence de UNG (10% du niveau normal) (Di Noia & Neuberger, 2002, Imai et al., 2003). Les CDB aux régions S sont ensuite maturées en extrémités franches et liguées par NHEJ (Revue : Rush, Fugmann, & Schatz, 2004). Il a été noté que le rapprochement des deux régions S avec CDB, c'est à dire la formation d'une synapse n'était pas prélude à l'action d'AID (contrairement à RAG dans la V(D)J) mais indispensable au bon déroulement de la CSR. Ainsi, en absence de synapse, des CDB sont formées aux régions S mais leur religature aboutit au phénomène d'intra switch : c'est à dire à la religature de deux cassures double brin générées au sein de la même région switch et une recombinaison abortive (internal switch deletion ou ISD) (Difilippantonio et al., 2008; Reina-San-Martin et al.,2007, Bothmer et al., 2010).

AID a un potentiel hautement mutagène ainsi elle est régulée à de multiples de niveaux. Sa transcription est limitée aux cellules B activées au sein des centres germinatifs par de nombreux facteurs de transcription. Par exemple, l'activation des cellule B par l'IL4 (interleukine 4) et CD40 induisent l'activation des facteurs Stat6 et NF-κB respectivement, et leur fixation à différents motifs du gène *Aidca* (codant pour AID) (Huong et al., 2013). Le contrôle post-transcriptionnel d'AID est assuré par différents miARN induisant la répression de son l'ARN messager (Borchert, Holton, & Larson, 2011). AID a également un accès très limité à l'ADN par sa restriction cytoplasmique contrôlé par son motif NES (Nuclear export signal) en N-terminal et une séquence en C-terminal (cytoplasmic retention determinant) (Pasqualucci et al., 2004**,** Patenaude et al., 2009). De plus, au sein du noyau AID a une durée de vie très restreinte du à sa poly-ubiquitynation engendrant sa dégradation par le protéasome (Aoufouchi et al., 2008). AID est également phosphorylée sur de nombreux résidus influençant probablement son interaction avec différentes protéines (non décrites) et modulant la CSR et/ou la SHM. La restriction d'AID au locus des gènes des Ig est essentielle. En effet

des translocations d'oncogènes, cibles non spécifiques d'AID, au locus *IgH* menent à l'apparition de lymphomes. Par exemple, la translocation *C-Myc/IgH* est observée au sein de cellules de patients atteints de lymphomes de Burkitt (Chiarle et al., 2011, Klein et al., 2011). Le taux de mutations aux loci *Ig* est estimé comme étant de 200 à 1000 fois plus élevé que dans le reste du génome, cependant les facteurs impliqués dans la restriction d'AID à ces loci restent à caractériser.

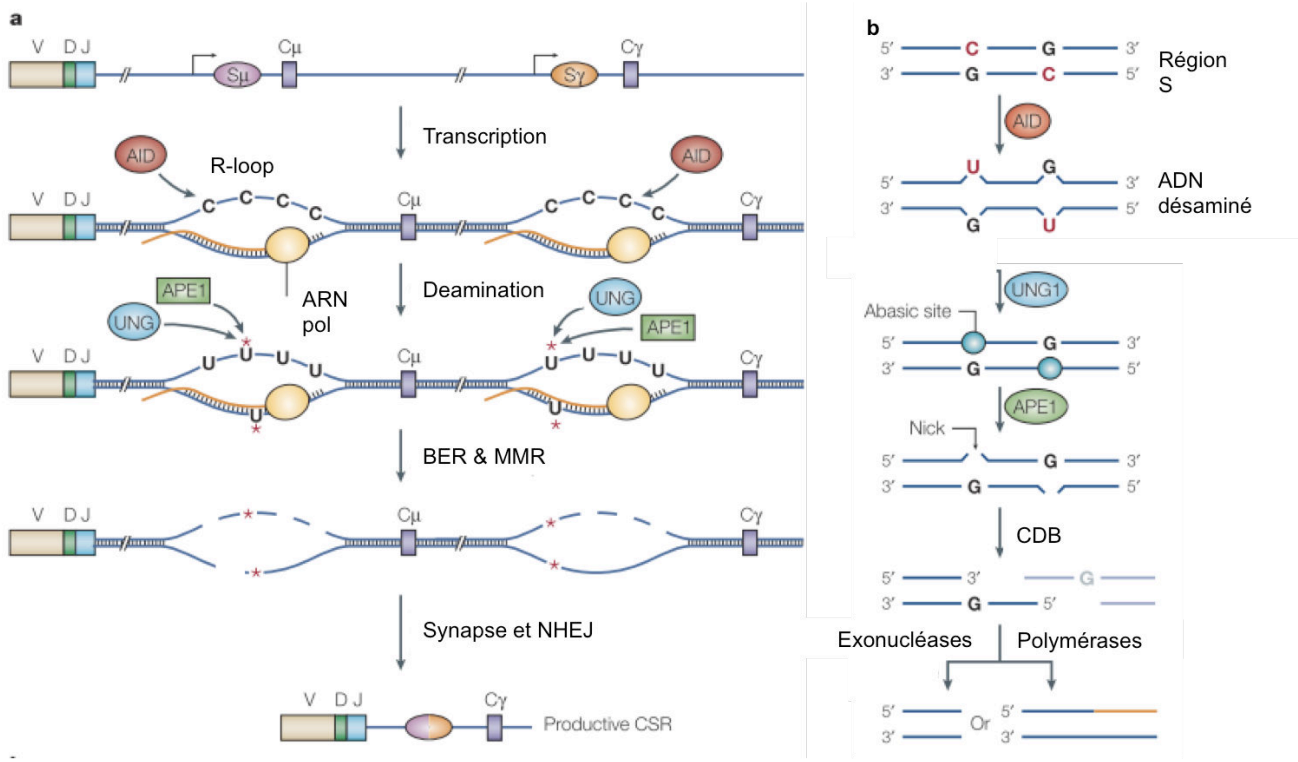


Figure 7: La Commutation de classe ou CSR (Class Switch recombination)

(a) Mécanisme de la commutation de classe : La transcription des gènes C_h permet la formation de boucles R (ou R-loops) au niveau des régions S et l'exposition d'ADN simple brin reconnu par AID. Le MMR et le BER permettent l'introduction de nombreux nicks sur les deux brins d'ADN (*). Deux nicks proches sur les brins opposés peuvent générer une CDB. Deux CDB dans deux régions switch (ici Sμ et Sγ) vont être rapprochés (synapsées) par un processus qui requiert des les protéines 53BP1, ATM, DNA-PKcs et MLH1 (mutL homologue 1). La commutation de classe s'achève par la fusion des deux régions S par NHEJ.

(b) Génération de CDB aux régions S par AID / UNG / APE1 : AID desamine les cytidines (C), les convertissant en uraciles (U). Le mésappariement G-U peut-être pris en charge par le BER (Base-Excision Repair) et son effecteur UNG (Uracil-N glycosylase). UNG ôte la deoxyuridine (U) créant un site abasique (cercles bleus). A partir des sites abasiques, APE1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease 1) introduit de nombreuses cassures simple brin (ou nicks). La prise en charge des extrémités par une exonucléase (inconnue) ou par des polymérases TLS (ligne orange) génère une cassure double brin franche (blunt).

3. Pathologies associées à un défaut de EJ

L'importance du EJ dans le maintien de la stabilité du génome est reflétée par la sévérité du phénotype des patients et des souris présentant une mutation d'un des gènes du mécanisme. Le phénotype observé comprend entre autre un déficit immunitaire combiné sévère (**SCID** pour Severe combined immunodeficiency)(de Villartay, 2009). Par exemple, les souris ayant une mutation dans les gènes *XRCC6* ou *XRCC5* (codant respectivement Ku70 et Ku80) sont de petites tailles et présentent une SCID, une radiosensibilité et des tumeurs (Boboila et al., 2010, Simsek & Jasin, 2010, Daley & Wilson, 2005). Chez l'homme, aucune mutation de ces gènes n'a été répertoriée, reflétant l'importance de Ku. De même aucune mutation de XRCC4 n'a été répertoriée et seulement des mutations hypomorphes de *PRKDC* (codant DNA-PKcs) et *LIG4* ont été recensées (S. Zhang et al., 2011, Chistiakov et al., 2009). Les patients présentant des mutations des gènes *NHEJ1* (Cernunnos ou XLF) ont également été décrits, tous présentant un retard de croissance, une immunodéficience, une microcéphalie et de l'instabilité génétique (Buck et al., 2006, Revy et al., 2006, Callebaut et al., 2006, Vera et al., 2013). Une inactivation totale du gène *DCLRE1C* (Artémis) entraine une SCID et une radiosensibilité (Ege et al., 2005). Revues sur les phénotypes dus à une mutation perte de fonction du NHEJ : (de Villartay, 2009, Bunting & Nussenzweig, 2013).

Régulation du EJ: Résection et translocations

Le NHEJ est un mécanisme essentiel pour la survie cellulaire et il intervient de manière efficace pendant la V(D)J et la CSR (Yan et *al*., 2007, Deriano & Roth 2013). Cependant, il doit être extrêmement régulé pour éviter (1) la perte d'information génique due à l'action de l'A-EJ et (2) les réarrangements résultant de la ligature de deux d'extrémités d'ADN ne provenant pas de la même cassure double brin (Hlatky, 2012). Le recrutement de protéines permettant la protection des extrémités contre l'action des nucléases et la mobilité de la chromatine endommagée modulent l'action du NHEJ.

A. Régulation de la résection

Le choix entre les différents systèmes de réparation se fait via la régulation de la résection (Grabarz et al., 2012). En G1, celle-ci doit être inhibée afin de contrecarrer l'action de l'A-EJ. En S et G2, sa stimulation permet l'initiation de la RH. Différentes protéines, régulées a cours du cycle cellulaire et se fixant aux extrémités d'ADN, permettent cette régulation.

1. Hétérodimère Ku

De part sa fixation à l'ADN, Ku permet la stabilité des extrémités des cassures double-brin dans toutes les phases du cycle cellulaire (Shao et al., 2012, Soutoglou et al., 2007). Ku maintiendrait les extrémités d'une même cassure double brin à proximité via la formation d'une synapse (Cary et al., 1997, Soutoglou et al., 2007). Le maintien et la stabilité des extrémités d'une CDB est principalement du à la protection de celle-ci contre la résection. Ku permet cette protection : *in vitro*, Ku inhibe l'activité exonucléase du complexe MRN et d'EXO1 (Sun et al., 2012). De plus, Ku possède une affinité pour l'ADN double brin 100 fois supérieure à celle de PARP1, il inhibe donc sa fixation aux cassures double brin et l'activation de la résection (Ariumi et al., 1999, Cheng et al., 2011). La compétition PARP1/Ku fut la première fois mise en évidence dans les DT40 : PARP1 promeut la HR et/ou l'A-EJ et Ku contrecarre son action (Hochegger et al., 2006**,** M. Wang et al., 2006**).** Ainsi, le complexe Ku protège le génome contre les réarrangements découlant de l'A-EJ (Guirouilh-Barbat et al., 2004, Weinstock et al., 2007, Weinstock et al., 2011). Le KO de la *LIG4* entraîne une létalité embryonnaire associée une sévère apoptose neurale. Ce phénotype est compensé par une inhibition de Ku, potentiellement car l'A-EJ n'est plus inhibé et donc plus à même de réparer les CDB des cellules neuronales (Frappart & McKinnon, 2008). Les cellules Ku déficientes, irradiées en phase S, présentent une très forte instabilité chromosomique suggérant que Ku est indispensable à la protection du génome même lorsque la recombinaison homologue est possible (Nagasawa et al., 2011).

Cependant, plusieurs enzymes réduisent la capacité de fixation de Ku à l'ADN. C'est le cas de CtIP, MRE11 et le complexe Fanconi. Ceux-ci, produisent des structure d'ADN ou des régions d'ADN simple brin que Ku est moins à même de fixer et favorisent la RH (Sartori et al., 2007, Pace et al., 2010). Le C-NHEJ est inhibé par la génération d'ADN simple brin (J.

Ross Chapman, Taylor, & Boulton, 2012) : Le complexe CtIP/MRN permet de décrocher KU des extrémités double-brin afin d'initier la résection. Ceci est possible en phases S et G2 par l'activation de CDK1 (Symington & Gautier, 2011). Celle-ci permet la stimulation de l'activité de CtIP et favorise son interaction avec BRCA1 par la phosphorylation de ses résidus T847 et S327 (Huertas & Jackson, 2009, Yu & Chen, 2004).

2. Les complexes 53BP1-RIF1-PTIP, BRCA1-CtIP et BLM

Il existe un deuxième niveau de régulation de la résection, dépendant du cycle cellulaire dont l'ensemble des acteurs vient d'être caractérisé. 53BP1 (ou TP53BP1) et BRCA1 sont les protéines clés de cette régulation l'un favorisant le NHEJ par l'inhibition de la résection et l'autre la RH en la stimulant (Figure 8).

i. Inhibition de la résection : 53BP1, RIF1 et PTIP

Comme évoqué précédemment, le recrutement de 53BP1 se fait via la reconnaissance de H2AK15ub et de H4K20me2 : 53BP1 stimule l'action du C-NHEJ par son interaction avec la chromatine aux sites de CDB entrainant l'inhibition de la résection. Le mécanisme exact de cette inhibition reste incompris : l'homo-dimérisation de 53BP1 et son interaction avec les nucléosomes constitueraient une barrière physique empêchant la fixation des nucléases (Dimitrova et al., 2008, Lottersberger et al., 2013). Les souris *53bp1-/-* sont radiosensibles et présentent des anomalies chromosomiques typiques d'un défaut de réparation de l'ADN, son inhibition dans les cellules DT40 conduit à une sensibilité aux radiations ionisantes (Morales et al., 2003; Ward et al., 2003, Iwabuchi et al., 2006; Nakamura et al., 2006). Cependant, cette radiosensiblité est plus faible que celle observée en absence des protéines Ku, XRCC4 ou LIG4, 53BP1 n'étant pas indispensable au bon déroulement du NHEJ, mais favorisant son action. Les cellules déficientes pour BRCA1 ont un taux de RH très limité, la réparation des CDB est donc presque totalment effectuée par le NHEJ entrainant de l'instabilité génétique. L'inactivation de *53bp1* au sein de ces cellules supprime cette instabilité génétique, et restaure la RH suggérant que 53BP1 inhibe la résection et la RH (Bouwman et al., 2010, Bunting et al., 2010). Physiologiquement, la V(D)J et la CSR sont altérées chez les souris *53bp1-/-* . Les CDB formées durant la CSR subissent une résection excessive et sont majoritairement réparées par de l'A-EJ. De plus, l'intra switch (internal switch deletion ou ISD) est largement augmenté en absence de 53BP1 (Difilippantonio et al., 2008; Reina-San-Martin et al.,2007, Bothmer et al., 2010). Cette recombinaison interne n'aboutissant pas à un changement d'isotype est surtout effectuée par l'A-EJ. En effet, les régions S contenant de nombreuses séquences répétées, la réparation des ISD par MH serait favorisée (Reina-San-Martin, Chen, Nussenzweig & Nussenzweig, 2007, Boboila et al., 2010). En plus de son rôle inhibiteur de la résection, 53BP1 stimule la formation d'une synapse permettant le rapprochement des extrémités éloignées générées par RAG ou AID et leur prise en charge par le NHEJ (Difilippantonio et al., 2008). Au niveau des télomères, 53BP1 stimule la mobilité des télomères dysfonctionnels (déprotégés), favorisant ainsi l'action du NHEJ et les fusions télomériques (Dimitrova et al., 2008).

53BP1 est phosphorylé par ATM sur de nombreux résidus en réponse aux CDB (Panier & Boulton, 2014). **RIF1** (RAP1-intercating factor 1) et **PTIP** (PAX transactivation activation domain-interacting protein ou PAXIP1) sont deux protéines recrutées aux CDB via leur interaction avec 53BP1 après l'activation d'ATM (Silverman et al., 2004, Gong et al.,

2009, Panier et al., 2012). RIF1 se fixe au niveau du domaine N-term de 53BP1, domaine contenant de multiples résidus Ser/Thr-Gln phosphorylés par ATM (Di Virgilio et al., 2013, Bothmer et al., 2011, Chapman et al., 2013, Feng et al., 2013). Son inhibition conditionnelle au sein de cellules B de souris entraîne également un défaut de CSR comparable à celui observé dans les cellules *53bp1-/-* (Chapman et al., 2013). Les effets de RIF1 et 53BP1 sur la sensibilité aux radiations ionisantes ne sont pas synergiques, suggérant que RIF1 serait l'acteur principal de l'inhibition de la résection par 53BP1 (Chapman et al., 2013, Escribano-Díaz et al., 2013). La perte de RIF1 ou de 53BP1 entraine une hyper résection au niveau des régions switch du locus *IgH* durant la CSR (Chapman et al., 2013, Di Virgilio et al., 2013). Cependant, l'analyse des jonctions de réparation au sein de cellules possédant un substrat de NHEJ laisse à penser que l'inhibition de la résection se ferait via l'action commune de 53BP1 et RIF1 : le premier permettant de réguler l'accessibilité des enzymes aux extrémités et le deuxième régulant l'activité des nucléases (Grabarz et al., 2013). Récemment décrit, PTIP interagit avec 53BP1 au niveau de sa Ser25 phosphorylée, sérine phosphorylée par ATM (Munoz et al., 2007). A l'instar de 53BP1 et RIF1, PTIP contribue à la fusion des télomères dysfonctionnels et son inhibition permet la restauration de la RH au sein de cellules *Brca1-/-*. Cependant, PTIP n'est pas requis pour la CSR (Callen et al., 2013). De plus, dans les cellules DT40, une inhibition de PTIP conduit à un défaut de RH et non pas de NHEJ (X. Wang et al., 2010). Son rôle reste donc à clarifier.

L'ensemble de ces études indique que **53BP1, RIF1 et PTIP protègent contre l'hyper-résection des extrémités d'ADN de CDB**. 53BP1 et RIF1 auraient un rôle à la fois dans la réparation des CDB physiologiquement programmées (CSR) et dans le NHEJ pathologique (fusions télomériques) alors que PTIP n'interviendrait que dans le NHEJ pathologique. (pour revues : Escribano-Diaz & Durocher, 2013, Panier & Boulton, 2014).

ii. Stimulation de la résection : BRCA1/CtIP

Plusieurs études ont démontré le rôle de BRCA1 dans l'inhibition de la fixation de 53BP1 et RIF1 aux CDB en phase S (J. R. Chapmann et al., 2012, Bunting et al., 2010, Feng et al., 2013). Même si, ni 53BP1 ni RIF1 ne sont ubiquitinés en phase S, l'activité E3 ligase de BRCA1 semble essentiel à la dissociation du complexe (Escribano-Díaz et al., 2013). CtIP est également responsable de la dissociation du complexe de protection des extrémités ; dans les cellules humaines elle est phosphorylée sur les résidus Ser327 et Thr487 par CDK. Ces phosphorylations permettent respectivement son interaction avec BRCA1 et l'activation de son activité enzymatique. Elles sont également cruciales pour l'inhibition de la formation de foci RIF1 en S et G2 (Escribano-Díaz et al., 2013, Feng et al., 2013). Le complexe **BRCA1-CtIP permet donc la dissociation du complexe pro-EJ en S-G2** et l'initiation de la résection prélude à la RH.

iii. Les agents doubles : BLM, BRCA1 et Rif1

L'hélicase BLM a un rôle double dans la régulation de la résection par MRN et CtIP au cours du cycle cellulaire. En G1, elle interagit avec 53BP1 et permet l'inhibition de l'A-EJ chez la drosophile et dans les cellules humaines (Gaymes et al., 2002, Grabarz et al., 2013). En S et G2, son activité hélicase est activée via son interaction avec TopIIIα et elle promeut la résection et la RH (Grabarz et al., 2013). De même, il existe une interaction

BRCA1-Ku80 en phase G1 qui stabilise la fixation de Ku aux CDBs et donc favorise la fidélité du EJ (Jiang et al., 2013). Récemment un rôle double de Rif1 de *S. cerevisae* a été décrit : Rif1 est impliqué dans la promotion de la résection ; il déplace Rad9 (homologue de 53BP1) des extrémités et favorise l'action du complexe de résection MRX-Sae2. Ces rôles doubles d'acteurs de la réparation reflétent une régulation fine de l'engagement de la cellule vers un prosessus de résection.

3. Le cas de RAG

Les CDB générées durant la V(D)J sont exclusivement prises en charge par le C-NHEJ. L'inhibition de 53BP1, ATM, H2AX ou MDC1, facteurs de la DDR impliqués dans la protection des extrémités, n'affecte que très légèrement l'efficacité de formation du coding joint lors de la V(D)J. De plus, les souris *Cernunnos* déficientes, malgré une forte radiosensibilité, ne présentent pas de déficit immunitaire, attestant d'un bon déroulement de la V(D)J (G. Li et al., 2008).

Le complexe RAG, qui est à l'origine des CDBs lors de la V(D)J, serait responsable (1) de la protection des extrémités contre la résection prélude à la RH et au A-EJ (G. S. Lee et al., 2004, Corneo et al., 2007) et (2) du rapprochement des extrémités indépendamment de Cernunnos lors de la V(D)J. Cependant, une délétion d'une protéine de la DDR (53BP1, ATM ou H2AX) combinée avec la perte de Cernunnos provoque un blocage du développement lymphocytaire et un défaut de réparation des CDB générées par RAG. Suggérant que RAG pourrait compenser un défaut de protection ou un défaut de rapprochement des extrémités, respectivement effectuées par la DDR ou le C-NHEJ, mais pas les deux (Pour revue : Deriano & Roth, 2013).

4. CSR et A-EJ

Durant la CSR, l'A-EJ serait plus qu'un mécanisme de « secours » en cas de défaut de C-NHEJ, il a été proposé comme acteur de la CSR (Yan et al., 2007). L'inhibition de CtIP diminuant l'efficacité du CSR dans les cellules C-NHEJ proficientes (Lee-Theilen et al., 2012). Au sein de cellules B de souris inductibles pour la CSR (lignée CH12F3), une équipe a récemment décrit que le taux désamination de l'ADN, reflétant l'action d'AID, influençait le choix entre C-NHEJ et A-EJ. En effet, plus le niveau de désamination est bas, plus la réparation des CDB s'effectue par utilisation de MH. Le C-NHEJ et l'A-EJ ne seraient pas en compétition pour la réparation des CDB lors de la CSR mais agiraient en parallèle en fonction de la densité de désamination aux régions switch. Un taux bas de désamination favorisant le recrutement de CtIP (Cortizas et al., 2013).

5. Transcription et RH

Au sein de cellules de mammifères (CHO = Chinese Hamster Ovary cells) il a été décrit que les CDB situées dans les séquences transcrites étaient préférentiellement prises en charge par la RH (Nickoloff, 1992). Récemment, il a été plus précisèment décrit, au sein de cellules humaines, que le contexte chromatinien et plus spécifiquement l'activation de la transcription dicte le choix du mécanisme de réparation (Aymard et al., 2014). Ainsi, la RH

visualisable par ChIP de RAD51, prend en charge les CDB apparaissant au sein d'une région transcrite : porteuse de la marque d'histone H3K36me3.

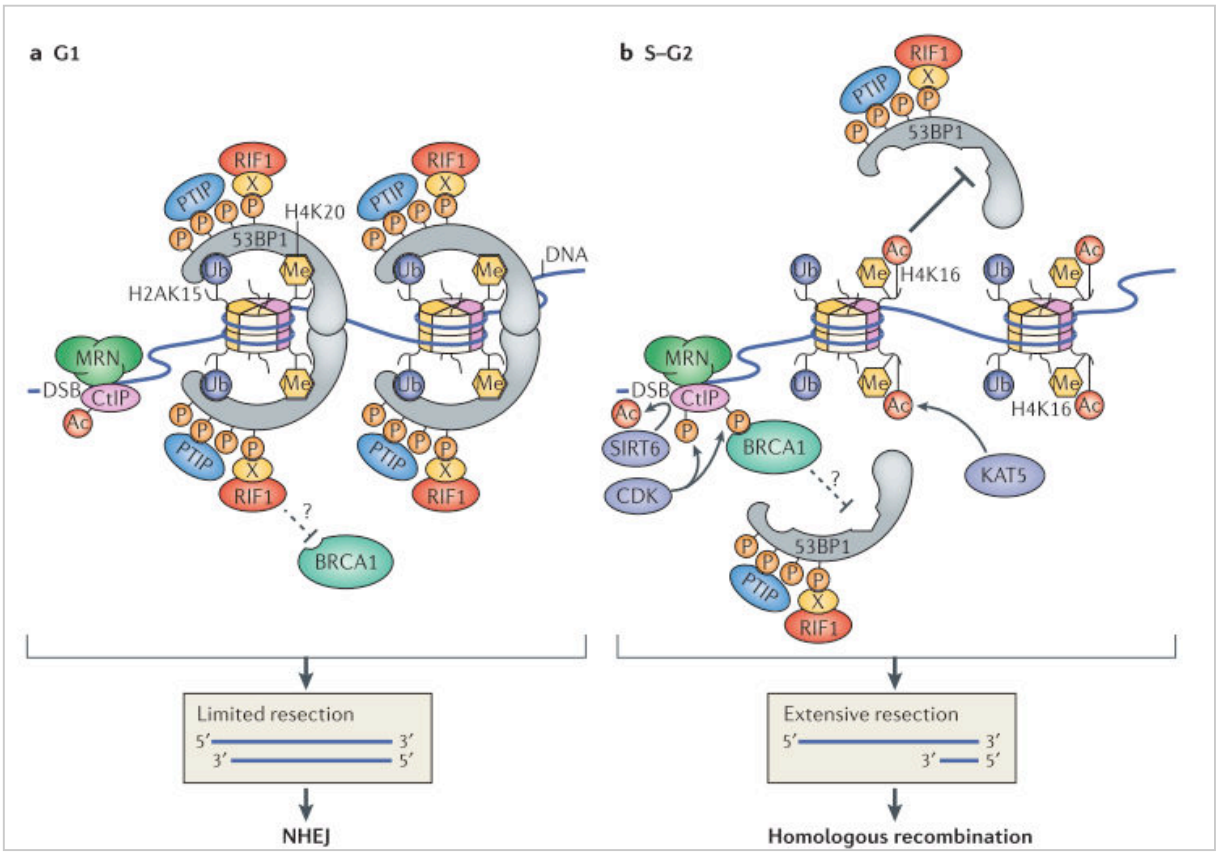


Figure 8 : Régulation de la résection : 53BP1 et BRCA1.
Figure extraite de (Panier & Boulton, 2014)

a | En G1, l'homo-dimère 53BP1 se lie aux marques d'histones H2AK15ub et H4K20me2 et recrute les protéines RIF1 et PTIP, les deux interagissant avec son domaine N terminal contenant les motifs Ser/Thr-Gln (S/T-Q) phosphorylés par ATM. L'interaction de RIF1 avec 53BP1 n'est pas décrite, elle peut être directe ou via un adaptateur protéique (X). De plus, il n'est pas exclu que PTIP et RIF1 se fixent de manière séquentielle à deux molécules 53BP1 distinctes et non pas simultanément sur la même comme représenté. Le complexe DNA-53BP1-RIF1 inhibe l'association de BRCA1 avec MRN/CtIP (via un mécanisme inconnu). Le mécanisme d'inhibition de la résection par le complexe PTIP-53BP1 n'est pas connu. Ces complexes permettent de limiter la résection aux CDB afin de favoriser le NHEJ et d'inhiber la RH.

b | Dès l'entrée en phase S, CDK phosphoryle CtIP, ce qui promeut son interaction avec BRCA1 et inhibe l'association de RIF1 et PTIP avec 53BP1 et sa fixation à la chromatine. L'acétyle transférase KAT5 (ou TIP60) acétyle l'histone H4 sur la lysine 16 (H4K16ac) ce qui réduit l'interaction 53BP1-H4K20me2. De plus, l'activité de CtIP est favorisée par la dé-acétylase SIRT6 qui ôte l'acétylation inhibitrice de CtIP. Ces évènements permettent la résection 3'→5' des extrémités d'ADN conduisant à une réparation par RH.

B. NHEJ, translocations et cancer

Toute cellule tumorale présente des anomalies chromosomiques indépendamment du type ou de l'origine de la tumeur : des anomalies numéraires ou des réarrangements (Mitelman, 2000). Les translocations sont issues de fusions aberrantes de matériel génétique entre chromosomes. Elles peuvent être la conséquence de la transformation cancéreuse mais également la cause de la tumorigénèse par formation de fusion de gènes à potentiel oncogénique. Une translocation peut découler d'un changement de matrice durant la RH ou de l'apparition concomitante de plusieurs cassures double brin, le rapprochement de leurs extrémités et leur réparation illégitime (Meaburn, Misteli & Soutoglou, 2007). Jusqu'à peu, le déroulement séquentiel et temporel des événements aboutissant à la formation d'une translocation était totalement inconnu. Récemment, par un système permettant la visualisation de la formation de ces réarrangements dans cellules vivantes humaines, il a pu être mis en évidence que (1) les translocations avaient lieu seulement quelques heures après induction de CDB et tout au long du cycle cellulaire et (2) le rapprochement des extrémités et leur réparation étaient deux étapes distinctes, pouvant être découplées, dans la formation de translocation (Roukos et al., 2013).

1. Translocations et chromothripsis

Les translocations ne sont pas spécifiques des cellules tumorales : un faible pourcentage de cellules embryonnaires contiennent des translocations (pour 1000 embryons viables, 0,7 contiennent des translocations) (Warburton, 1991; Giardino et al., 2009). Ces translocations n'aboutissant pas forcément à une pathologie, elles sont tolérées par l'organisme. Au sein des cellules cancéreuses, un grand nombre de translocations affectant la prolifération cellulaire a été caractérisé. Par exemple, la translocation *BCR-ABL1* (Abelson tyrosine-protein kinase 1) dans la leucémie myéloïde chronique (CML). En 2007, il a été estimé que les fusions de gènes étaient à l'origine de 20% des cancers humains (Mitelman, Johansson, & Mertens, 2007). Depuis, de nouvelles techniques telles que le séquençage haut débit (next-generation sequencing) et les analyses de transcriptome ont permis d'identifier de nouvelles fusions à l'origine de la carcinogénèse (Stephens et al., 2009, Cancer Genome Atlas Network, 2012). Cependant, une cellule tumorale présentant de nombreux réarrangements intra et inter-chromosomiques, dans la plupart des cas la translocation à l'origine de la carcinogénèse ne peut être définie (Bunting & Nussenzweig, 2013).

De plus, en 2011, par l'utilisation combinée de l'analyse des polymorphismes par micro-array (single nucleotide polymorphism [SNP] array) et d'une technique de séquençage massif à haut débit (paired-end sequencing) une nouvelle forme hyper-complexe de réarrangements a été mise en évidence et fut baptisée **chromothripsis.** Chez un patient atteint de CML il fut mis en évidence 42 remaniements localisés sur le bras long d'un chromosome 4 (Stephens et al., 2011). Le phénomène de chromothripsis est le résultat de multiples réarrangements (jusqu'à plusieurs centaines) se produisant au cours d'un seul événement cellulaire, pour aboutir à la formation d'un ou de plusieurs chromosomes fortement remaniés, à l'image d'un *patchwork*. (Figure 9b). Les facteurs causals du chromotripsis n'ont pas été clairement identifiés : les multiples cassures de l'ADN précédant ce phénomène de chromotripsis peuvent faire suite à l'utilisation de différentes drogues génotoxiques, de processus endogènes (topoisomérases…) ou seraient la résultante d'une apoptose abortive

(Tubio & Estivill, 2011). L'analyse de plus de 700 lignées cancéreuses et de 2700 tumeurs a permis d'évaluer à 3% la fréquence globale de ces réarrangements massifs, avec une incidence particulièrement élevée (25%) au sein des tumeurs osseuses (Maher & Wilson, 2012) (Revues chromothripsis : Pellestor et al., 2014, Jones & Jallepalli, 2012).

2. NHEJ et translocations

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la formation de translocations (Figure 9). Cependant, le C-NHEJ et l'A-EJ sont les acteurs majeurs de la formation de chromotripsis (Kloosterman et al., 2012). De plus, les translocations ont lieu tout au long du cycle cellulaire, en accord avec l'action du NHEJ (Roukos et al., 2013). Plusieurs études ont démontré que l'inhibition de Ku70, Ku80 ou LIG4 réduisait l'instabilité génétique et les réarrangements chromosomiques dans les cellules BRCA1 (Adamo et al., 2010; Bunting et al., 2010; Pace et al., 2010). L'inhibition de DNA-PKcs réduit l'instabilité génétique au sein des cellules BRCA1 et BRCA2 (Patel et al., 2011). De même, des cellules issues de cancer du sein ayant des mutations *BLM* et *XRCC2* sont particulièrement sensibles à la réparation aberrante par NHEJ et accumulent des anomalies chromosomiques (Stephens et al., 2012; Thompson et al., 2012). Au sein des cellules cancéreuses, le NHEJ contribue à une réparation infidèle conduisant à l'apparition de translocations. Au sein de cellules proficientes pour la réparation des CDB, l'A-EJ serait responsable de la religature illégitime conduisant à des translocations. En effet, des microhomologies au point de ligature ont été observées dans 85% des translocations au sein de cellules embryonnaires murines contenant un système rapporteur de translocations (Weinstock, Elliott, & Jasin, 2006).

De plus, l'A-EJ est particulièrement apte à la formation de translocations en absence du C-NHEJ : dans un système permettant de mesurer la translocation *IgH-Myc*, la délétion de Ku70 ou LIG4 augmente le taux de translocations (Yan et al., 2007; Boboila et al., 2013). Les souris KO Ku70-Ku80 ou XRCC4, LIG4 et déficientes pour p53, condition *sine qua none* pour obtenir un KO XRCC4 ou LIG4, développent des tumeurs avec des translocations présentant des microhomologies (M. J. Difilippantonio et al., 2002; Zhu et al., 2002). Par l'inhibition de l'A-EJ, le C-NHEJ et en particulier Ku protège, en partie, le génome contre les translocations (Fattah et al., 2010, Weinstock et al., 2011, Guirouilh-Barbat et al., 2004). Cependant, une inhibition de la LIG3 et de la LIG1 réduit la fréquence d'apparition de translocations et l'utilisation de MHs dans les cellules C-NHEJ proficientes suggérant que l'apparition de translocations A-EJ dépendante est possible même en présence du C-NHEJ (Simsek et al., 2011). Cependant le C-NHEJ peut également être responsable d'évènements de translocations au sein de cellules proficientes pour la réparation des CDB (Guirouilh-Barbat et al., 2004, Piganeau et al., 2013).

C'est notamment le cas au niveau des télomères. Une fusion de deux chromatides au niveau de leurs télomères est source d'instabilité génétique et peut engendrer une translocation et des cycles de « cassure-fusion-pont » favorisant l'amplification d'oncogène (figure 9C). Ces fusions télomériques sont dépendantes de Ku70 et LIG4 (Celli et al., 2006; Smogorzewska et al., 2002). Une étude récente de « next-generation sequencing » a permis de séquencer dans les cellules humaines les principaux points de cassures/fusions (breakpoint) à l'origine des translocations (Chiang et al., 2012). Sur l'ensemble des séquences, seulement 30,5% présentaient des microhomologies. De plus, les réarrangements chromosomiques

observés dans les cellules de cancer de la prostate ne contiennent pas de microhomologie et dans celles de cancer de sein, elles sont limitées à 2bp (Stephens et al., 2009; Berger et al., 2012).

3. Formation de translocations, facteurs impliqués

Plusieurs paramètres influencent en tout logique la fréquence de translocation : la quantité, la persistance et la proximité des CDB. Tout d'abord, plus le nombre de CDB à chaque site de translocation est élevé, plus la fréquence de translocation est importante. Ce nombre est dépendant du taux de génération de CDB (par IR, RAG ou AID) et de leur persistance dans le temps (Rocha et al., 2012, Hakim et al., 2012). Ensuite, la fréquence à laquelle deux CDB se retrouvent juxtaposés (« synapsées ») est importante. Cela est particulièrement mis en évidence pendant la V(D)J et la CSR. La recombinaison est fortement altérée en absence de la formation d'une synapse (en absence de 53BP1 par exemple). L'accessibilité des protéines de réparation pourrait donc également être mise en jeu lors de la formation de translocations. Enfin la proximité des séquences présentant simultanément des CDB sur deux chromosomes différents favorise également la fréquence de translocation interchromosomique.

Ainsi **l'organisation spatiale du génome, les mécanismes de réparation des CDB et la mobilité de la chromatine endommagée** sont des facteurs d'influence majeurs dans la génération de translocation (pour revue : Roukos & Misteli, 2014).

i. Organisation spatiale du génome

Les génomes n'étant pas organisés de manière aléatoire dans l'espace cellulaire à trois dimensions (Cremer & Cremer, 2001), il a été proposé que l'organisation spatiale du génome influencerait la propension de deux chromosomes à former une translocation (Misteli, 2007). Deux chromosomes situés à proximité étant plus aptes à former une translocation que deux chromosomes distaux (Roukos et al., 2013). De plus, deux chromosomes avec une translocation réciproque se trouvent plus souvent en périphérie nucléaire et à proximité que deux chromosomes non transloqués (Bickmore & Teague, 2002). De même au niveau génique, la distance du gène MYC avec les gènes IGH, IGK et IGL est directement corrélée avec la fréquence de sa translocation au sein de ces locus chez les patients avec un lymphome de Burkitt (Roix et al., 2003). Il y a également une corrélation entre les translocations tissu-spécifiques et la localisation tissu-spécifique des chromosomes présentant les translocations (Nikiforov et al., 1999, Cremer & Cremer, 2001). Au sein de cellules pro-B transformées, les translocations observées se font plus souvent en *cis,* i.e sur le même chromosome, qu'en *trans* et cette translocation en *trans* est directement corrélée à la distance séparant les chromosomes impliqués (Y. Zhang et al., 2012). En 2013, l'équipe de Misteli (Roukos, Voss, et al., 2013) a développé une approche permettant de visualiser la formation de translocations. Cette approche a permis de conclure que plus de 80% des translocations se faisaient entre deux CDB séparées de maximum 2,5 μm (en accord avec la mobilité d'une seule cassure observée par Soutoglou et al., 2007 voir ci-dessous) démontrant que les translocations étaient majoritairement formées entre deux CDB proximales.

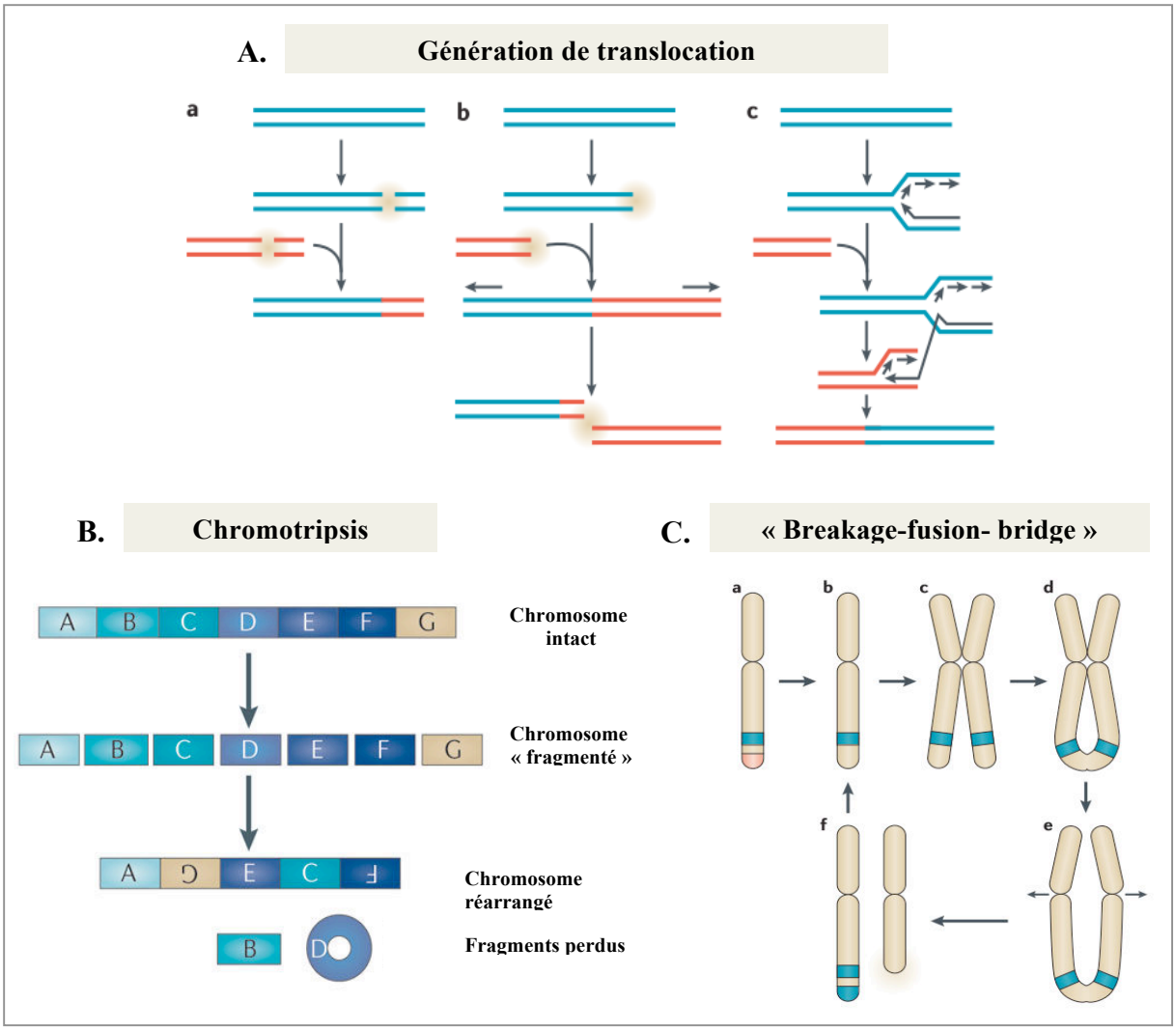


Figure 9: Réarrangements chromosomiques, translocations et chromothripsis

a | Génération de translocation : (a) Les translocations réciproques sont la conséquence de l'apparition de deux CDB sur deux chromosomes distincts (en rouge et bleu) et de leur prise en charge par NHEJ. (b) Les télomères déprotégés ou érodés sont reconnus comme CDB, l'activation de la DDR peut conduire à la fusion de ces extrémités télomériques. (c) Les translocations peuvent également être la conséquence d'un changement de matrice pendant la réplication, notamment après blocage des fourches : phénomène de MMBIR (Microhomology-mediated break induced replication) (revue : Hasting, 2009)

b | Chromotripsis : Au cours d'un seul événement catastrophique (apoptose abortive, radiations etc..) de multiples cassures double-brin se produisent dans une région chromosomique, entraînant une pulvérisation en fragments chromosomiques. La plupart sont recollés de manière aléatoire afin de reformer une structure chromosomique chaotique (chromosome réarrangé), alors que certains peuvent être perdus ou combinés sous forme de mini- chromosomes circulaires surnuméraires (double-minute fragment D).

c | Cycle de « Breakage-fusion-bridge » et amplification d'oncogène : (a) Les chromosomes sont protégés par les télomères (en rouge) (b) La perte de la protection télomérique entraine une activation de la DDR (c) Les cellules cancéreuses avec un défaut de checkpoint vont progresser à travers le cycle cellulaire et dupliquer le chromosome endommagé (d) La fusion chromatidique des télomères va former un pont anaphasique durant la mitose (e) Les centromères subissant des forces opposées durant la cytodiérèse, le pont anaphasique est soumis à un stress aboutissant à (f) une cassure chromatidique. Un chromosome dérivé peut contenir une seconde copie de l'oncogène et subir à nouveau un cycle de « break-fusion-bridge ». (Figures a et c tirées de (Bunting & Nussenzweig, 2013), figure b tirée de (Forment, Kaidi, & Jackson, 2012)). Ces études suggèrent que la religature des extrémités par appariement de MH est responsable d'une minorité d'évènements de translocations dans les cellules humaines (pour revue : Bunting & Nussenzweig, 2013).

ii. Régulation de la mobilité des CDB

La mobilité de la chromatine dans les cellules humaines a un impact sur le rapprochement des CDB et leur appariement est requis pour les fusions illégitimes des extrémités et la formation de translocations. Dès apparition de CDB, la DDR se met en place. L'accumulation des protéines de réparation forme des foci détectables par immunofluorescence. Plusieurs équipes ont analysé la mobilité (MSD ou mean squared displacement) de ces foci et donc de la chromatine après induction de CDB. Chez *S. cerevisae* et dans les cellules humaines, après induction **d'une seule cassure double brin**, les deux extrémités d'ADN générées restent « attachées » ensemble et leur mobilité est extrêmement réduite, d'environ $1\mu m^2.h^{-1}$, mobilité semblable à celle d'une fibre de chromatine non endommagée (Kruhlak et al., 2006, Soutoglou et al., 2007b). Comme évoqué précédemment, la fixation de Ku est un acteur de cette stabilité des extrémités et inhibe la formation de translocation. Récemment, une étude a également mis en évidence l'implication d'ATM dans la restriction de la mobilité des extrémités d'une CDB (Becker et al., 2014). Cette restriction serait due au remodelage de la structure chromatinienne post dommages (modifications d'histones) dépendant de l'activité kinase d'ATM.

La mobilité globale de la chromatine endommagée, après plusieurs CDB, semble dépendante du type de dommages. En effet, si la mobilité chromatinienne de cellules humaines après induction rayons X est très limitée, la chromatine endommagée par des particules α peut se déplacer sur plusieurs micromètres et conduit à un regroupement de la chromatine endommagée formant des « clusters » chromatiniens (Nelms et al., 1998, Aten et al., 2004). De même, les foci 53BP1 formés après radiations ionisantes sont beaucoup plus mobiles en comparaison à la chromatine non endommagée (Krawczyk et al., 2012). Chez la levure, la mobilité globale de la chromatine, que ce soit celle des cassures ou de la chromatine non endommagée, dépend des facteurs impliqués dans la recombinaison homologue tels que Rad51, Mec1 (ATR chez les mammifères), Rad53, Rad9 et Sae2 (Miné-Hattab & Rothstein, 2012, Dion at al., 2012). Dans les cellules murines, 53BP1 promouverait la mobilité des télomères déprotégés et leur fusion. Cependant, la mobilité des CDB n'est pas altérée dans les cellules humaines déficientes pour 53BP1 (Krawczyk et al., 2012). Ces observations suggèrent un rôle important des protéines de la DDR dans la mobilité de la chromatine endommagée, par des mécanismes restant à définir.

iii. Formation de la synapse, rapprochement des extrémités

Au sein des cellules humaines, les chromosomes homologues s'apparient aux sites de CDB formées après RI ou action d'une endonucléase afin de favoriser la recombinaison homologue. Le contact entre les chromosomes requiert l'activité conjointe de la transcription et de la kinase d'ATM (Gandhi et al., 2012). La recherche d'homologie s'effectue dès la formation de la CDB par mouvement aléatoire mais contraint des extrémités. La rencontre des extrémités de deux CDB conduit à un appareillement transitoire et une dissociation, la persistance de l'appareillement pouvant conduire à la génération de translocations (Roukos & Misteli, 2014). Chez la levure et les mammifères, γ-H2AX est trouvé à la périphérie des régions hétéro-chromatiniennes indiquant une décondensation de l'hétérochromatine ou le mouvement des cassures à la périphérie (Jakob et al., 2011, Kim et al., 2007). Cependant, si le

regroupement de CDB est systématique au sein des cellules de levure, il n'est pas courant dans les cellules de mammifères (Jakob et al., 2009)**.** En effet, un focus de réparation se forme par CDB et en cas de CDB multiples, chaque focus reste distinct. Durant la formation de translocation, les CDB proches se rapprochent ne formant plus qu'un seul focus de réparation qui disparaît après fusion des extrémités (Roukos & Misteli, 2014). Les facteurs promouvant l'appareillement, le maintien ou la dissociation des extrémités ne sont pas connus. Une des hypothèses serait que le partage de la machinerie transcriptionnelle favoriserait la translocation entre deux régions transcrites. Cette hypothèse est appuyée par le fait que (1) MYC et IGH, IGK et IGL partagent la même machinerie de transcription (Osborne et al., 2007) (2) Les points chaud de translocation se situent à proximité des sites d'initiation de la transcription dans les cellules B (Chiarle et al., 2011) (3) Les sites fragiles répliqués de manière précoce sont enrichis en régions hautement transcrites, leur fragilité corrèle avec leur activité transcriptionnelle et ils sont des partenaires de translocation dans 50% des lymphomes diffus à grandes cellules B (Barlow et al., 2013). L'activité transcriptionnelle augmenterait la probabilité de translocation en maintenant à proximité deux régions partageant la même machinerie de transcription.

L'implication de 53BP1 dans la formation d'une synapse permettant le rapprochement des extrémités semble restreinte en *cis* au locus IgH. En effet, l'inhibition de 53BP1 ne conduit pas à une augmentation de la fréquence d'évènements intra chromosomiques entre CDB très distales (27 Mb), proximales (1,2kb) ou d'évènements de translocations entre loci *IgH* et *Myc* (Bothmer et al., 2010, Bothmer et al., 2011). De plus, à une moindre échelle dans notre système intrachromosomique, l'inhibition de 53BP1 a le même impact sur l'efficacité du NHEJ quelque soit la distance séparant deux CDB (34 pb ou 3200 pb, voir article 1). Comme les fusions télomériques entre chromosomes sont dépendantes de 53BP1, d'autres facteurs doivent influencer son habilité à joindre les télomères déprotégés. Une hypothèse serait que l'organisation chromatinienne des télomères au sein de centres d'hétérochromatine (Almouzni & Probst, 2011) peut influencer la capacité de 53BP1 à former une synapse.

En 2013, Roukos et Misteli ont mis en évidence l'implication de MRE11 dans la formation de la synapse permettant l'appariement de CDB. L'inhibition de MRE11, mais pas d'ATM ou d'ATR, réduit l'appariement d'extrémités issues de deux CDB (i.e la formation d'un seul focus de réparation) et réduit le taux de translocations. De plus l'inhibition de l'activité kinase de DNA-PKcs n'a pas d'impact sur le taux d'appariement des extrémités mais conduit à une augmentation de la fréquence de translocations. Cette inhibition empêchant la dissociation de DNA-PKcs des extrémités, les auteurs ont émis l'hypothèse que le maintien de DNA-PKcs aux extrémités augmentait le laps de temps pendant lequel les extrémités pouvaient se rencontrer et fusionner et donc la probabilité de translocation.

Le complexe de cohésion

Le complexe de cohésion (ou cohésine) est un complexe en forme d'anneau extrêmement conservé de la levure jusqu'à l'homme nommé ainsi en raison de sa capacité à établir la cohésion entre chromatides sœurs. Cette fonction est essentielle en mitose, en méiose et pour la RH. Depuis quelques années de nouveaux rôles émergent ; en plus de sa capacité à établir un rapprochement physique d'ADN en *trans*, le complexe de cohésion permet le rapprochement de séquences éloignées en *cis* modulant ainsi la transcription, la réplication et d'autres mécanismes nécessitant une modulation de l'architecture chromatinienne comme la V(D)J.

A. Rôle canonique : la cohésion des chromatides sœurs

Le lien physique entre chromatides sœurs (en *trans*) est assuré par le complexe de cohésion de la phase S à l'anaphase. Ce lien est essentiel pour la RH en S/G2 et pour l'alignement des chromosomes et la ségrégation durant la mitose. Les cohésines assurent donc la transmission du matériel génétique durant la prolifération cellulaire.

1. Description du complexe et régulation de la cohésion

i. Anneau de cohésion

Le complexe core de cohésion est constitué de quatre sous unités ; **SMC1**, **SMC3**, **RAD21** (ou SCC1) et **SA** (ou STAG) formant un anneau (Figure 10) (Nasmyth, 2011). SMC1 et SMC3 appartiennent à la famille des ATPase SMC (Structural maintenance of chromosomes). Ces protéines sont conservées de la levure à l'homme et, comme les protéines SMC-like au sein des génomes des eubactéries et des archées, elles contribuent à l'organisation et à la dynamique chromatinienne du génome eucaryote (Hirano, 2005) (Pour revue: Wu & Yu, 2012). SMC1/SMC3 forme un hétérodimère via l'interaction de leur domaine Hinge. Cet hétérodimère forme avec une protéine non SMC, un complexe SMC fonctionnel pouvant hydrolyser l'ATP. RAD21 (ou SCC1) appartient à la famille des klésines et intéragit avec SMC1 et SMC3 pour fermer l'anneau. Chez les vertébrés deux autres protéines se lient à RAD21 : SA1 et SA2 (ou STAG1 et STAG2). La liaison du complexe SMC avec SA1 étant importante pour la cohésion télomérique et SA2 pour la recombinaison homologue et la cohésion centromérique (voir ci-dessous). D'autres protéines se lient au complexe afin de réguler son chargement sur l'ADN, sa dissociation et l'établissement de la cohésion tout au long du cycle cellulaire. Le complexe de cohésion assure également la cohésion méiotique, les sous-unités SMC1β et REC8 (ou RAD21L) remplaçant respectivement SMC1 et RAD21 (Peters, Tedeschi, & Schmitz, 2008).

ii. Cycle cellulaire

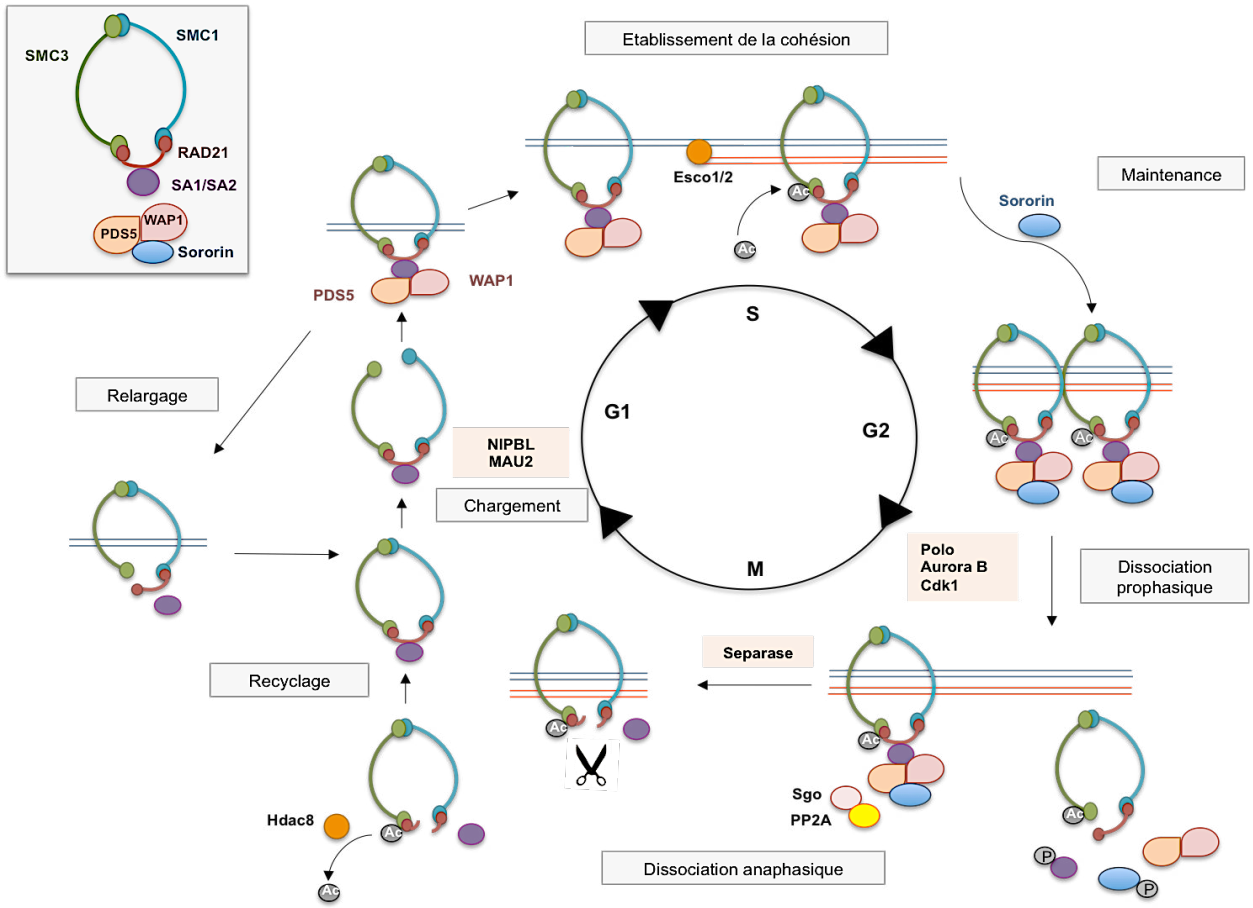
Le complexe est recruté en télophase et en G1 par l'hétérodimère **NIPBL** (Nipped-B homolog)/**MAU2** par un processus nécessitant l'hydrolyse de l'ATP et l'ouverture temporaire du complexe au niveau du domaine hinge de complexe SMC. Ce recrutement est dynamique : les protéines **PDS5** (precocious dissociation of sister chromatids 5) et **WAP1** (wings apart-like homolog) qui, associées avec le complexe au niveau de la chromatine, favorisent le relargage du complexe (Gerlich et al., 2006). La cohésion se fait durant la réplication par un processus nécessitant l'acétylation de SMC3 sur deux lysines (K105 et K113) par les acétyl-transférases **ESCO1** et **ESCO2** (CoATs = cohesin acetyltransferases) présentes au réplisome et l'hydrolyse de l'ATP par les SMC (Rolef Ben-Shahar et al., 2008). Cette modification entraine probablement un changement de conformation du complexe et contrecarre l'action de PDS5/WAP1 (Chan et al., 2012). Chez les vertébrés, l'établissement de la cohésion nécessite le recrutement par PDS5 et l'action de la **sororin** (Nishiyama et al., 2010). Les cohésines empêche la séparation prématurée des chomatides sœurs sous l'effet de traction des micotubules et facilitent l'attachement des kinétochores en mitose (Toyoda and Yanagida, 2006). En mitose, les chromosomes sont condensés et les cohésines se dissocient de la chromatine. La dissociation en prophase est médiée par WAP1 et facilitée par la phosphorylation de SA2 par **PLK1** (polo like kinase) (Shintomi and Hirano, 2010). Au niveau des centromères, la phosphorylation de SA2 est inhibée par le complexe shugosin-**PP2A** (protein phosphatase 2A). La cohésion centromérique permettant le bon alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique. En anaphase le complexe **APC/C** dégrade la **sécurine** afin que la **séparase** puisse cliver **RAD21** et le complexe de cohésion dissocié. Les CoDACs (Cohesin deacetylases) tel que **HDAC8** permettent le recyclage des complexes dissociés en mitose dans la phase G1 suivante (Revue Remeseiro et Losada, 2013 et figure 10).

2. Réparation post réplicative

i. Checkpoint G2/M et RH

Chez *S. cerevisae,* une réparation efficace des CDB par RH dépend de la cohésion des chromatides sœurs effectuée par le complexe de cohésion (Sjögren & Nasmyth, 2001). Suite à une CDB, les cohésines sont recrutées sur une région de 50 kb et établissent de nouvelles structures de cohésion dans l'ensemble du génome. Ce recrutement aux CDB induites en G2 est dépendant de Mec1 (ATM), Tel1 (ATR), γH2AX et du complexe MRX (MRN) Mre11/Rad50/Xrs2 (Heidinger-Pauli et al., 2008, Ström et al., 2004, Strom & Sjögren, 2007). Ce recrutement est indispensable à la RH (Sjögren & Nasmyth, 2001). Dans un même temps, les cohésines situées à proximité immédiate de la CDB sont dissociées afin de permettre le recrutement des protéines de la résection (McAleenan et al., 2013). Cette étape est assurée par la séparase qui clive Mcd1 (homologue de RAD21). De plus, les cohésines sont recrutées *via* Rad50 aux fourches de réplication stoppées suite à un stress réplicatif (après faible dose d'hydroxyurée), elles stimulent le redémarrage des fourches par RH (Tittel-Elmer et al., 2012). Ces observations suggèrent que les cohésines facilitent la RH en maintenant les

chromatides sœurs à proximité et/ou en stabilisant les deux extrémités du chromosome endommagé.



<u>Figure 10 :</u> Le complexe de cohésion durant le cycle cellulaire d'une cellule de mammifère.

Le complexe de cohésion représenté en haut à gauche est constitué de deux protéines SMC : SMC1 et SMC3, d'une sous unité kléisin RAD21 et d'une sous unité heat repeat SA1/2. Les protéines PDS5, WAP1 et la sororin interagissent avec le complexe et permettent sa régulation.
Le complexe de cohésion est chargé en G1 par NIPBL/MAU2 sur des sites restant à identifier. Les rôles antagonistes de NIBL/MAU2 et PDS5/WAP1 permettent une dynamique de recrutement et favorisent vraisemblablement le passage de la fourche de réplication. La cohésion s'effectue sur l'ADN répliqué par l'action conjointe de ESCO1/2 et de la sororin. La checkpoint mitotique permet la dissociation du complexe prélude à la ségrégation mitotique, cependant, les cohésines restent au niveau des centromères facilitant l'attachement des kinétochores et l'alignement des chromosomes.

Chez les vertébrés, il a été démontré que l'activité de cohésion régulée par la **sororin** était indispensable à la RH (Sonoda et al., 2001, Potts et al., 2006). De plus, au sein des cellules de souris *Rad21+/-*, il y a moins de recombinaison à un locus spécifique (gene targeting) et d'échange d'ADN entre chromatides sœurs (Xu et al., 2010). La même chose est observée au sein de cellules humaines traitées avec un siRAD21 (De Piccoli et al., 2006). Les cohésines sont cependant recrutées aux CDB tout au long du cycle cellulaire (Potts et al., 2006, Caron et al., 2012) de manière dépendante de MDC1 et de RNF168 et probablement via l'interaction de NIPBL avec HP1α (Oka et al., 2011). On parle d'établissement de la cohésion suite à un dommage ou de voie **DIC** (DNA-damage Induce Cohesion). Cependant, contrairement à *S. cerevisae*, le recrutement de cohésines à la CDB au sein des cellules de mammifères s'effectue sur une région très limitée : 1 kb de part et d'autre d'une CDB (Caron et al., 2012). En plus de l'induction de la cohésion, les cohésines ont un rôle dans la propagation de la DDR suite à la génération de CDBs. En effet, elles stimulent l'activation de la kinase Chk2 et le recrutement de 53BP1 aux cassures double brin (Watrin & Peters, 2009). De plus, SMC1 et SMC3 sont tous deux phosphorylés par ATM sur deux sérines, et ces modifications sont requises pour l'activation du checkpoint intra S et du checkpoint G2/M (S.-T. Kim et al., 2002, Yazdi et al., 2002, Luo et al., 2008, Watrin & Peters, 2009).

En raison de son rôle dans la RH et la transition G2/M, une perte partielle d'un membre du complexe de cohésion entraîne une sensibilité accrue aux agents endommageant l'ADN. Par exemple, les souris hétérozygotes pour le gène *Rad21* sont hypersensibles aux radiations ionisantes. Une irradiation totale de la souris (8 Gy) engendre, 30 jours après, 30% de mortalité de plus chez les animaux *Rad21+/-*.

ii. Architecture et mobilité de la chromatine endommagée

Chez *cerevisae*, la RH est majoritaire. Les chromatides sœurs sont maintenues ensemble par le complexe de cohésion dès la phase S favorisant l'invasion du brin homologue après CDB. Si jamais la chromatide sœur n'est pas accessible ou également endommagée, une recherche « globale » d'homologie de séquence à lieu, visualisable par observation de la mobilité des foci Rad52 (Gehlen, Gasser & Dion, 2011). La mobilité des foci de réparation Rad52 est ainsi augmentée en absence du complexe de cohésion, la chromatide sœur n'étant pas physiquement proche et accessible à la RH (Dion et al., 2013).

Chez l'homme, l'inhibition par siRNA de SMC1 n'a pas d'effet sur la mobilité des extrémités d'une seule CDB (Soutoglou et al., 2007b, Becker et al., 2014).

iii. Téloméres

Les cohésines participent à l'organisation chromatinienne des télomères essentielle à leur transcription et à leur réplication.

CTCF et les cohésines se lient au niveau des promoteurs sub-télomériques, favorisent le recrutement de l'ARN polymérase II et la transcription des séquences TERRA (telomeric repeat-containing RNA). TRF2 se lie au niveau de ces séquences TERRA et permet le recrutement de protéines de l'hétérochromatine (HP1, ORC) et le maintien de H3K9me3, marque d'hétérochromatine (Deng et al., 2009). Cette organisation favoriserait la formation de « T-loop », structure chromatinienne permettant la protection des séquences télomériques.

En absence du complexe et/ou de CTCF, les séquences TERRA sont moins transcrites, les protéines du complexe shelterin TRF2 et TRF1 sont moins recrutées (ou stabilisées) aux séquences sub-télomériques et donc la voix DDR est activée aux télomères. Ainsi, en absence de CTCF ou de RAD21, il y a formation de foci de réparation (γH2AX et 53BP1) aux télomères (Telomere Dysfunction-Induced Focus : TIFs) (Deng et al., 2012).

Le complexe est également recruté aux séquences télomériques répétées par l'interaction entre la sous-unité SA1 et la protéine shelterin Tin2, cette interaction est requise pour la cohésion télomérique des chromatides sœurs et la réplication télomérique (Canudas & Smith, 2009, Remeseiro et al., 2012). En effet, la cohésion télomérique est évaluée par le taux de d'échange de séquences télomériques entre les chromatides sœurs (ou T-SCE) et celui-ci est deux fois moins important dans les cellules déficientes pour SA1 que dans les cellules normales. De plus, la réplication des séquences télomériques est affectée en absence de SA1 ce qui entraine une fragilité (des CDB au sein des séquences télomériques) et des défauts de ségrégation durant la mitose. Les auteurs ont postulé que la cohésion était importante pour la stabilisation des fourches bloquées au niveau des séquences télomériques et qu'elle facilitait le redémarrage des fourches ou la réparation par RH des fourches collapsées (Remeseiro et al., 2012).

Il est à noter, qu'en plus de tous ces rôles dans la réplication, la transcription et la protection des télomères, l'inhibition de la cohésion entraîne un arrêt prolongé en mitose qui est suffisant à l'activation d'un checkpoint télomérique et à la formation de TIFs (Hayashi et al., 2012).

B. Rôle en cis : Formation de bloucles chromatiniennes

Le rôle des cohésines ne se limite pas aux phases S et G2/M. Le complexe module l'architecture nucléaire par formation de boucles chromatiniennes en *cis* tout au long du cycle cellulaire. Ces boucles de taille variable permettent l'interaction entre des domaines chromatiniens plus ou mois séparés et la régulation de la transcription, la réplication et la réparation.

1. Transcription

Le rôle des cohésines dans la transcription varie d'une espèce à l'autre, de simple activateur ou répresseur transcriptionnel chez la levure et la drosophile, il permet un arrangement complexe de la chromatine chez les mammifères.

Chez la levure, le complexe contribue à la régulation génique en repositionnant les gènes au sein du noyau : en les positionnant à proximité des nucléoles ou des foyers de tDNA (Gard et al., 2009). De manière globale, le complexe est exclu des régions activement transcrites et s'accumule aux sites de transcription convergents (Ocampo-Hafalla and Uhlmann, 2011). Chez *Pombe*, il agit comme terminateur de la transcription (Gullerova and Proudfoot, 2008).

Cependant, chez la drosophile melagonaster, les cohésines s'accumulent au niveau des gènes transcrits où elles colocalisent avec l'ARN polymérase II (Misulovin et al., 2008). Cette régulation par le complexe de cohésion est indépendante du rôle de médiateur de la cohésion des chromatides sœurs (Pauli et al., 2010). Le complexe permet l'expression de gènes impliqués dans le développement (Dorsett, 2009). Récemment, il a été montré que les

cohésines pouvaient lever l'inhibition transcriptionnelle instaurée par les protéines Polycomb, bien que dans certains cas, le complexe inhibe la transcription avec celles-ci (Cunningham et al., 2012; Hallson et al., 2008; Schaaf et al., 2009). Pour finir, les cohésines influencent l'élongation transcriptionnelle (Fay et al., 2011; Schaaf et al., 2013).

Chez les mammifères, les cohésines intéragissent avec l'insulator **CTCF** (CCCTC-binding factor) et participent à l'inhibition de l'interaction enhancer/promoteur de nombreux gènes (Parelho et al., 2008; Wendt et al., 2008). Cette fonction est assurée par la formation des boucles chromatiniennes avec CTCF à de nombreux loci tels que : le locus l'interféron γ (Ifng) (Hadjur et al., 2009), du locus Igf2/H19 (Nativio et al., 2009), du locus de la β-globin Chien et al., 2011; Hou et al., 2010). Les cohésines peuvent aussi affecter la transcription en interagissant avec d'autres facteurs : par exemple les cohésines se fixent au niveau du récepteur estrogène α à des sites non liés par CTCF dans les cellules du cancer du sein. Démontrant un effet tissu-spécifique du complexe (Schmidt et al., 2010). Dans les cellules souches embryonnaires murines, les cohésines et un médiator (un co-activateur transcriptionnel) facilitent la formation de boucles entre les enhancers et les promoteurs des gènes requis pour maintenir la pluripotence (Kagey et al., 2010). Le complexe régule positivement l'expression du gène Myc et des protocadherines (Monahan et al., 2012; Rhodes et al., 2010).

Des expériences de ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) aux sites de CDB induites enzymatiquement ont démontré qu'en absence de RAD21 (SCC1) ou de SMC3, l'histone H2AX était phosphorylé (γH2AX) de manière plus importante aux sites initiateurs de la transcription (TSS) normalement associés au complexe de cohésion. Cette augmentation de niveau de γH2AX inhibe la transcription. Le complexe de cohésion serait donc responsable du maintien de l'activité transcriptionnelle de ses gènes cibles après dommage, par inhibition de la phosphorylation de H2AX aux sites TSS auquel il est associé (Caron et al., 2012).

2. Réplication, allumage des origines de réplication et sites fragiles

En G1, la machinerie réplicative se met en place par association de facteurs protéiques au niveau des origines de réplication, on parle d'assemblage de complexes pré-réplicatifs (pre-RCs). Les pre-RCs sont constitués, entre autres, des protéines ORC (origin recognition complex) et MCM (Minichromosome maintenance). Ces complexes indispensables à l'allumage des origines sont tous regroupés avant l'initiation de la réplication par un mécanisme non déterminé. Les régions inter-origines, ou réplicons, forment alors des boucles (ou boucles) d'ADN, visualisables sous forme d'un halo péri-nucléaire (Buongiorno-Nardelli et al. 1982 Berezney et al. 2000, Courbet et al., 2008). La taille d'un réplicon, est modulable chez les eucaryotes, elle dépend du nombre d'origines allumées et de la vitesse de réplication (Courbet et al., 2008). Il a été démontré que le complexe de cohésion était à l'origine de la formation ou de la stabilisation des boucles « inter-origines » indispensables à l'allumage des fourches de réplication (Guillou et al., 2010).

Un groupe a mis en évidence l'implication de SMC1 dans l'expression des gènes situés dans les sites fragiles suite à la formation d'une CDB (Musio et al., 2005). En effet, l'inhibition de SMC1 par siARN conduit à l'apparition de CDB au niveau des sites fragiles. Cet effet est amplifié par l'ajout d'un stress réplicatif altérant la réplication de ces sites. Les

auteurs ont suggéré que durant la réplication, un blocage de fourche au niveau des sites fragiles conduit à la phosphorylation de SMC1 via ATR et permet la réparation des CDB engendrées.

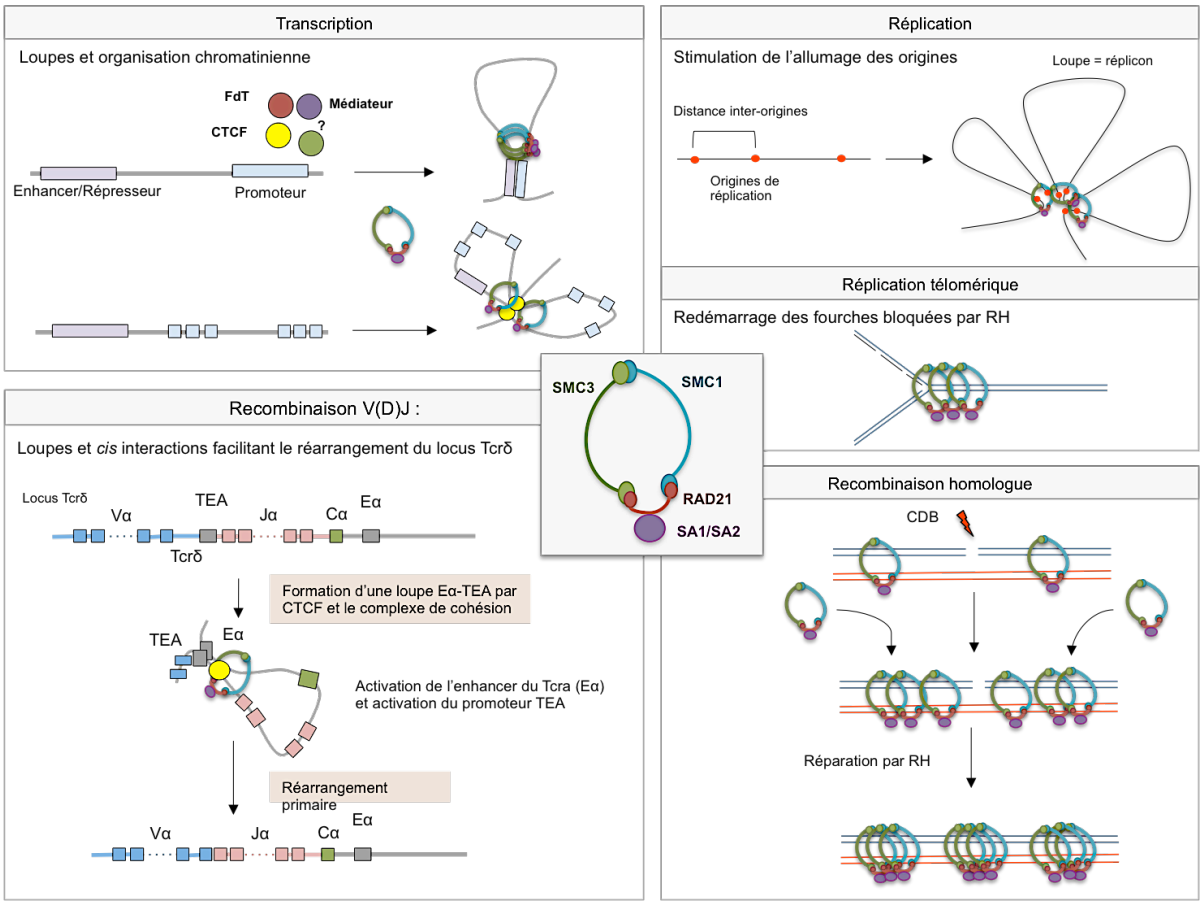
3. Complexe de cohésion, V(D)J et CSR

i. V(D)J

Par la création de boucles, les cohésines facilitent le réarrangement du locus Tcrα, étape essentielle dans la différenciation des cellules T (Seitan et al., 2011, Shih et al., 2012, Shih & Krangel, 2013) voir figure 11. Les expériences effectuées par (Seitan et al., 2011) se sont déroulées dans des cellules T de souris dont la délétion du locus *Rad21* était effectuée à un moment bien précis de la différenciation : un stade où les cellules sont CD4+/CD8+ et ne cyclent plus (arrêtées en G1) mais réarrangent leur locus Tcrα. Cette technique a permis de s'affranchir du rôle des cohésines durant la mitose et la réplication et donc d'avoir la possibilité de créer des cellules KO. Shih et al., 2012, ont utilisé la technique de 3C au sein de thymocytes déficients pour CTCF. Les auteurs ont démontré que CTCF et les cohésines permettaient les interactions entre éléments distaux réorganisant ainsi la chromatine des thymocytes durant la V(D)J. Plus précisément, CTCF et les cohésines influencent l'interaction entre Eα et les promoteurs des gènes Vα et Jα (en inhibant les autres interactions possibles) favorisant la formation d'une synapse et leur recombinaison (voir figure 11).

Au cours de la V(D)J, le locus *Igh* (2,5 Mb) est compacté afin de rapprocher les gènes V_H des gènes D_H -J_H. Des expériences de ChIP au sein de cellules pro-B on révélé plus de 60 sites dans la région des gènes V_H auxquels CTCF et Rad21 étaient recrutés (Degner et al., 2011). Par 3D-FISH, les auteurs ont pu mesuré la compaction du locus *IgH* en absence de CTCF. Celle-ci est réduite attestant du rôle de CTCF dans la structure 3D du locus.

Notons que CTCF et les cohésines ne sont pas impliqués dans la contraction du locus *Trca*, les mécanismes impliqués restent à caractériser.



<u>Figure 11</u> : Les rôles multiples du complexe de cohésion

ii. CSR

Deux papiers publiés en octobre 2013 démontrent un rôle des cohésines dans la CSR (Enervald et al., 2013, Thomas-Claudepierre et al., 2013). Le premier est basé sur l'étude des lymphocytes B de sept patients atteints du syndrome de Cornélia de Lange (CdL), avec une mutation hétérozygote, perte de fonction du gène codant pour NIPBL. La stimulation de ces cellules *in vitro* n'a pas montré d'altération majeure de la CSR. Cependant, l'analyse des jonctions Sμ-Sα a démontré une utilisation accrue des MHs. Cet effet fut confirmé par transfection d'un plasmide contenant un substrat de NHEJ et analyse des jonctions au sein de fibroblastes dérivés de patients CdL : 22,9 % des séquences présentées des MHs associées à une délétion en absence de NIPBL, contre 6,3% des séquences dans les cellules contrôles. Un défaut de recrutement de 53BP1 est également observé 30 minutes après IR au sein des cellules B. De plus, les enfants atteints de CdL ne semblent pas avoir de défaut de V(D)J (datas non publiées mais citées). Les auteurs proposent donc un rôle de NIPBL dans la balance A-EJ/C-NHEJ. Cependant, même si la mutation NIPBL confère un phénotype CdL, elle est hétérozygote, l'effet d'une perte totale de chargement des cohésines durant le CSR est donc surement sous-estimé.

Le deuxième papier est basé sur stimulation de la CSR dans des cellules B de souris (CH12F3) après inhibition du complexe de cohésion par shARN (Thomas-Claudepierre et al., 2013). Les auteurs ont décrit une interaction AID/complexe de cohésion (Smc1, Smc3, Nipbl et Wapa1) après des expériences de co-immunoprécipitations. De plus, par ChIp un recrutement de Smc1 et Smc3, indépendant de CTCF est observé aux alentours des régions S. Un shSmc1, Smc3, Nipbl ou WapaI affecte la CSR d'environ 20 à 30% sans affecter la transcription des régions S. Le séquençage des régions switch démontre également une utilisation accrue des Mh lors de la réparation des CDB (>7 pb). Les auteurs ont conclu eux aussi à un rôle des cohésines dans le recrutement de 53BP1 aux CDB lors de la CSR.

C. Cohésinopathies et cancer

1. Cohésinopathies

Deux syndromes ont été reliés à des mutations dans les gènes codant pour le complexe de cohésion: le **syndrome de Cornelia de Lange (CdLS)** et le syndrome de Roberts (RBS). Le CdLS touche 1 enfant sur 30 000. Ce syndrome est caractérisé par une dysmorphie faciale très reconnaissable accompagnée d'un déficit intellectuel de sévérité variable, d'un important retard de croissance à début anténatal et d'anomalies des extrémités (oligodactylie voire amputation plus sévère). Le RBS est une maladie rare caractérisé par un retard de croissance prénatal, des malformations des membres et des anomalies carnio-faciales. Ces deux cohésinopathies découlent de mutations de différents gènes du complexe (Horsfield et al., 2012). Alors que plus de la moitié des individus atteints de CdL présente des mutations hétérozygotes du gène *NIPBL*, les mutations au sein des gènes codant SMC1, SMC3, RAD21 et HDAC8 sont trouvées à de basses fréquences (Deardorff et al., 2012). Les cellules issues de patients CdLS ne présentent pas de défaut de cohésion mais une sensibilité accrue aux agents endommageant l'ADN (Dorsett and Ström, 2012) et une modification de la

transcription de certains gènes (Liu et al., 2009). Des analyses par microarray ont également révélé une altération transcriptionnelle de nombreux gènes (Kawauchi et al., 2009).

Les cellules issues d'embryons de souris SA1-/-, ayant une forte altération développementale et meurent avant la naissance, présentent un défaut de cohésion télomérique et une altération transcriptionnelle comparable aux CdL (Remeseiro et al., 2012b). Les souris hétérozygotes ne présentent pas de phénotype CdL mais ont une espérance de vie plus courte et une tumorigénèse accrue. Les souris KO pour Pds5 (A ou B) ne sont pas viables et présentent des anomalies du développement similaires à la pathologie CdL (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2007).

Ces phénotypes suggèrent que l'expression génique, particulièrement durant le développement, est beaucoup plus sensible à la quantité et/ou à l'activité du complexe cohésion que les autres fonctions du complexe i.e. la réparation de ADN et la cohésion. Cette idée est appuyée par la caractérisation des altérations observées en absence d'ESCO2, protéine essentielle à l'activité de cohésion du complexe. En effet, des mutations homozygotes dans le gène *ESCO2* sont la cause du **syndrome de Roberts** (Vega et al., 2005). ESCO2 étant indispensable à l'établissement de la cohésion de l'hétérochromatine péricentrique (Whelan et al., 2012), une perte de la cohésion péricentromérique des chromosomes cohésion est observée chez les cellules issues de patients RBS. Une baisse de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose durant le développement sont également observés dans un modèle RBS de Zebrafish (Mönnich et al., 2011).

En 2010, le syndrome de **Warsaw Breakage** a été décrit chez un patient. Ses caractéristiques cliniques et cellulaires sont semblables avec celles du RBS et de l'anémie de Fanconi. Ce syndrome rare est causé par une mutation bi-allélique du gène codant pour l'hélicase CHLR1 qui est requise pour la cohésion des chromatides sœurs chez la levure et les mammifères. L'interaction de cette hélicase avec le complexe a été mise en évidence mais son rôle reste méconnu (Parish et al., 2006, pour revue : Bharti et al., 2014).

2. Cancer

Des mutations inactivatrices de SA2 (STAG2) ont retrouvées au sein de glioblastomes, de mélanomes et de sarcomes (sarcome d'Ewing) (Solomon et al., 2011). Des mutations de SMC1, NIPBL et SMC3 sont également reportées dans les cancers du colon (Barber et al., 2008). Les cellules issues de ces tumeurs présentent une forte instabilité génétique : de nombreuses anomalies chromosomiques et un nombre aberrant de chromosomes (aneuploïdie ou diploïdie) : conséquences directes d'un défaut de cohésion.

De manière plus intéressante, des mutations et délétions au sein des gènes codant pour le complexe de cohésion ont été retrouvées de manière récurrente dans différents cancers myéloïdes (Kon et al., 2013). Ces mutations entrainent une perte de la fixation du complexe à la chromatine mais n'affectent pas le nombre d'anomalies chromosomiques, suggérant une cohésion normale des chromosomes. Les cellules issues des tumeurs myéloïdes, mutées dans le gène RAD21 prolifèrent de manière similaire aux cellules WT. La transfection d'un plasmide codant pour une protéine RAD21 fonctionnelle diminue la prolifération cellulaire des cellules tumorales. Une inhibition du complexe, du moins de *RAD21*, serait donc un élément important pour la progression tumorale des cancers myéloïdes.

Objectifs de la thèse et cheminement scientifique

Le mécanisme canonique de ligature non homologue d'éxtrémités de CDB (C-NHEJ) est impliqué à la fois (1) dans la reparation des CDB faisant suite à des agents exogènes et (2) dans la réparation de CDB physiologiquement programmées, lors des mécanismes de diversification des génes des immunoglobulines ; la V(D)J et la CSR. Le C-NHEJ est donc indispensable à la stabilité et à la diversité du genome. L'existence d'un mécanisme alternatif délétère (l'A-EJ) et la présence de réarrangements tels que les translocations reflètent la nécessité d'une régulation fine du NHEJ. Une régulation passe par le recrutement des protéines Ku, 53BP1, RIF1 et BLM qui permettent la protection des extrémités contre la resection, l'action de l'A-EJ et donc la perte d'information génétique. Lors de la formation de translocations, les extrémités de deux CDB éloignées sont rapprochées, appareillées et liguées. Dès lors nous pouvons supposer que (1) la réparation de CDB éloignées différe de celle d'extrémité proches et (2) des facteurs impliqués dans l'organisation de la conformation chromatinienne et/ou dans la mobilité de la chromatine endommagée influencent l'efficacité et/ou la fidélité de la réparation par EJ. Dans un premier temps, nous avons utilisé des substrats intrachromosomiques construits au sein du laboratoire de Bernard Lopez, par Josée Guirouilh-Barbat afin d'étudier le rôle du complexe de cohésion dans le EJ. En effet, en raison de son implication dans l'architecture chromatinienne, la formation de boucles et dans la réparation des CDB, le complexe de cohésion était un potentiel acteur de la réparation par EJ d'extrémités eloignées. Les résultats sont présentés dans l'article 1. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'efficacité et la fidélité de la réparation par EJ en fonction de la distance séparant deux CDB, les résultats sont présentés dans l'article 2.

The cohesin complex protects against genome rearrangements by preventing the end-joining of distal DNA double-strand-ends

Camille Gelot[1], Josée Guirouilh-Barbat[1,2], Bernard S. Lopez[1,2*] and Said Aoufouchi[1*]

[1]Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, CNRS UMR 8200 and Université Paris Sud, Equipe labélisée "LIGUE 2014", 114, Rue Edouard Vaillant, 94805 VILLEJUIF.

* Corresponding authors

Keywords: Cohesin, double strand break, NHEJ, genome rearrangements, DNA ends mobility,

ABSTRACT

DNA double-strand breaks (DSBs) repair is essential for genome stability/diversity, but can also generate genome rearrangements. Although non-homologous end-joining (NHEJ) is required for genome stability maintenance, the joining of distant double strand ends (DSE) should inexorably lead to genetic rearrangements. Here we addressed the question of the mechanisms preventing the joining of distant DSE. We show that depletion of the cohesin protein RAD21 or the cohesin loader NIPBL specifically stimulates the end-joining of I-SceI-induced DSBs distant of 3200bp, while the joining of close DSEs (32bp) remained unaffected. Consistently, exome sequencing revealed that RAD21 ablation generates large chromosome rearrangements. Moreover, cytogenetic analysis revealed a strong induction of replication stress-induced chromosome fusions, which involved distant DSEs, upon RAD21 silencing. These data reveal a role for the cohesin complex in the protection against profound genome rearrangements arising through ligation of distant DSEs. Remarkably, the process is sufficiently sensitive to restrict the end-joining of DSEs only few kb apart, suggesting an efficient limitation of DSEs motility by the cohesin complex, rather than a role in the NHEJ machinery itself.

INTRODUCTION

Several mechanisms can join DSEs in a sequence homology-independent manner. The KU/Ligase IV-dependent canonical NHEJ (C-NHEJ) acts in a conservative manner, but is adaptable to imperfectly cohesive ends, while, in contrast, A-EJ (alternative end-joining) is highly mutagenic leading to deletions at the repair junction frequently associated with the use of micro-homologies distal from the DSB. A second level of end joining-mediated genome alteration, results from the joining of distal double strand ends (DSE). This process is physiologically used in V(D)J recombination and class switch recombination (CSR), in the course of highly controlled processes that generate the immune repertoire. However, unscheduled end-joining of distant DSEs inevitably yields to potentially deleterious genome rearrangements. When the two DSEs are topologically closed, they can be immediately tethered together and sealed. In contrasts, two distant DSEs cannot be immediately tethered and should be first brought together, prior to their ligation. This spatio-temporal gap constitutes a risk for genome integrity. Indeed, in a parallel study, we have shown that a distance of 3.2kb between two DSBs, which is large at the nucleotide level but very short to the nucleus scale, was sufficient to jeopardize genome stability, affecting both the efficiency and the accuracy of end-joining, and generating complex rearrangements at the sealed junctions (manuscript in preparation). More specifically, single DSEs could occur upon replication stress generates; therefore, the end-joining of replication stress-induced DSEs inexorably involves distant DSEs, consequently leading to genome rearrangements. We thus hypothesized that organisms have developed mechanisms aiming at protecting genome stability against the joining of distant DSEs. The cohesin complex appears to be a rational candidate for such a role. Indeed, the cohesin complex and loader are recruited to DSBs and have been proposed to be actors of NHEJ pathway in CSR (Caron et al. 2012; Oka et al. 2011; Enervald et al. 2013; Kong et al. 2014; Thomas-Claudepierre et al. 2013).The cohesin complex is composed by a SMC1/SMC3 heterodimer, a kleisin subunit RAD21 (also named MCD1 or SCC1) and a stromal antigen subunit (SA) SA1 or SA2. This ring-like protein complex mediates chromosomal cohesion by embracing the two sister chromatids after replication until anaphase, allowing proper chromosome segregation during mitosis (Guacci et al., 1997; Klein et al., 1999; Potts et al., 2006). Remarkably, upon replication stress, the cohesin complex favors sister chromatid exchanges (SCEs),

maintaining genome stability, as discussed [REF]. Such cohesion role might thus restrict DNA trafficking. Moreover, several interphase roles of the cohesin complex have been reported: the complex forms DNA loops allowing *cis*-interactions between genes and their transcriptional regulation factors, long range interaction during V(D)J recombination and origins firing during replication (Wendt et al., 2008; Degner et al., 2011; Guillou et al., 2010).

Results

RAD21 or NIPBL depletion increases the efficiency of end-joining of distal but not of close double strand extremities. In order to investigate the impact of the cohesin complex on end-joining efficiency, according the distance between the DSEs, we silenced RAD21 or NIPBL in cell lines bearing the combination of substrates monitoring end-joining, depicted in Figure 1A. The first cell line (GCS5) harbors one substrate (GFP-34 bp) in witch the I-SceI sites are distant of 34bp (proximal ends), while the second cell line (GCSH14) harbors one substrate (GFP-3200 bp) with two I-SceI sites are located 3200 bp apart (distal ends); both substrate monitor end-joining through the expression of the GFP. In addition, both cell lines also contains a second substrate (CD4-3200) monitoring end-joining through the expression of the CD4 membrane antigen and in which the two I-SceI are located 3200bp apart (Figure 1A).

Strikingly, while the depletion of RAD21 (using two different siRNA) did no affect end-joining of close ends (34bp), it 2-fold stimulated the end-joining of 3200bp distant ends, with the GFP- as well as CD4-derived substrates (Figure 1B). Importantly, same results were obtained upon depletion of the cohesin complex loader protein NIPBL. Moreover, the double extinction RAD21/NIPBL lead to a stimulation of end-joining of distal ends, similar to that of depletion of RAD21 or NIPBL alone, suggesting that RAD21 and NIPBL act in an epistatic manner for the repression of the end-joining of distant DSEs.

Since none of these conditions significantly affected the efficiency of end-joining of close ends, collectively these data show that the cohesin complex does not affect the intrinsic activity of the end-joining machineries *per se*, but specifically represses the joining of distal ends, underlying a role on the control of DNA motility.

RAD21 inhibits both C-NHEJ and A-EJ of distal ends. Silencing ligase IV in RAD21-depleted cells abolished the stimulation of end-joining resulting from the RAD21 depletion, but not to the level of ligase IV-depleted cells (Figure 2A). These data show that RAD21 represses at least C-NHEJ, which is ligase IV-dependent, but also suggest that A-EJ (ligase IV-independent) should also be affected by RAD21.

To test this conclusion, we then sequenced the repair junctions obtained with the CD4-3200 substrate. Indeed, using this substrate, we have previously characterized the A-EJ pathway, which systematically deletes the four 3'-protruding nucleotides (3'-Pnt) generated by the cleavage by I-SceI, at the junctions, while, in contrast, C-NHEJ uses at least one of the four 3'-Pnt (Guirouilh-Barbat et al., 2004, 2007; Rass et al., 2009 summarized in PLoS Genet and in Figure 2B). Therefore, any specific alteration of either C-NHEJ or A-EJ should modify the ratio "use of the 3'Pnt/deletion" at the repair junction. Since depletion of RAD21 did not unbalance the frequency of 3'-Pnt usage, this also supports the fact that both A-EJ and C-NHEJ were stimulated by RAD21 abrogation (Figure 2B), consistently with the above data, upon Ligase IV silencing.

RAD21 prevents large deletions and large insertions at repair junctions. We have previously shown that end-joining of distal DSEs favors large deletions, insertions and complex rearrangements (manuscript in preparation). Since RAD21 favors end-joining of distal ends we thus addressed the question whether its depletion also favors large deletions and insertions at the repair junction. Indeed, depletion of RAD21 leads to a two-fold increase of deletions (> 30 nts) and insertions (>45 bp) at the repair junctions of distal ends (Figure 2C and supplementary data S1). The insertions arise from the I-SceI expression vector and more frequently, from chromosomal sequences. These chromosomal sequences correspond to duplication of the region surrounding the DSBs, as already described (Guirouilh-Barbat et al., 2004, et Zucman PNAS 1998), to sequences from different chromosomes and to mosaic (patch?) of sequences from different chromosomes, revealing thus complex rearrangement at the end-joining junctions (Figure 2C and supplementary data S1).

RAD21 protects against chromosome rearrangements. Since RAD21 impairs the end-joining of distal ends, it should therefore protect against chromosome rearrangements, which involved distant ends.

We first performed exome sequencing. Although this strategy does not give a complete landscape of the genome rearrangements, it is able to reveal a situation of general genome instability. Interestingly, sequences analysis revealed both intra and interchromosomal long-range rearrangements occurring only 72 hours after transfection with the RAD21 siRNA (Figure 3A and supplementary data

S2), i.e. occurring during 1 to 2 cell generation(s). Because of the underestimation of genome rearrangements resulting from the strategy and the short time of RAD21 extinction, these data suggest that ablation of the cohesin complex leads to profound genome rearrangements, involving distal DSEs. Moreover, beside intra- and inter-chromosome translocations, RAD21 depletion resulted in sequences deletions, insertion and duplication, consistently with the data obtained with the intrachromosomal NHEJ substrates used here (see above). Finally, in addition of long-range rearrangements that involved distant DSEs, sequence analysis revealed, at nucleotide level, mutations in several fragile sites (supplementary data S2) suggesting that unfaithful repair of breaks occurred at such sites consistently with a previously reported role for the cohesin complex in fragile sites expression and stability (Musio et al., 2005).

Second, we performed a cytogenetic analysis. GIEMSA staining revealed the occurrence chromatid beaks, chromosome breaks, and radial structures (see examples in Figure 3B). Depletion of RAD21 strongly stimulated the frequency of spontaneous chromatids breaks, consistently with the alterations in the fragile sites observed by exome sequencing (see above) and of radial structures (Figure 3C). Note that radial structures have been proposed to correspond to the joining of double strand ends of broken chromosomes or chromatids [Mills et al., 2004] and see examples in Figure 3C). Since such events actually correspond to the end-joining of distant DSEs, their increased upon RAD21 depletion is thus consistent with the facts that this situation i) accumulates chromosome and chromatid breaks (see Figure 3C) and ii) stimulate the joining of distant ends (see Figure 1B).

Because the replication stress generates single DSEs, which are distant from each other [REF], the end-joining of such DSEs, should generate genome rearrangements, including dicentric fusion chromosomes. Since the cohesin complex favors SCE and represses the joining of distant DSEs, the consequence of RAD21 ablation on chromosome instability should be exacerbated upon replication stress. To address this question, we performed cytogenetic analysis of metaphases 6h following addition of aphidicolin (APH), i.e. the metaphase that immediately followed the S phase challenged by APH. PNA labeling of both centromeres and telomeres, allowed to clearly identify interchromosome fusions and to distinguish between telomere fusion and intrachromosome fusion (see examples Figure 3D). Interestingly, upon exposure to APH addition, RAD21 loss strongly increased the frequency of interchromosomal fusions (Figure 3E). Importantly, interchromosomal fusion did not exhibit

intrachromosomal telomeric signals, showing that the fusions events occurred at intrachromosomal rather than at telomeric sequences, consistently with the fact that these fusion should arise through the joining of double strand ends generated by the replicative stress, i.e. all along the chromosomes.

Because interchromosomal fusions and radial structures directly result from the end-joining of two DSB carried by different chromosomes (Mills et al., 2004), i.e. distant DSBs, these data are highly consistent with the fact that cohesin complex protects against end-joining of distant ends, as shown above.

Discussion

One barrier protecting against genome rearrangements resulting from the joining of distant ends, should aim at limiting their synapsis. The present data reveal such guardian role for the cohesin complex. Indeed, the fact that RAD21 and NIPBL act epistatically, show that the protective role of against the end-joining of distal DSEs actually relies to the assembly of the cohesin complex. We show here that the cohesin complex specifically limits the joining of distal ends but not of close ends. Remarkably, the cohesin complex is not specific of one particular end-joining pathway since its ablation stimulates both C-NHEJ and A-EJ. Taken together, this shows that the cohesin complex should constraint the motility of the distal DNA ends, limiting thus their synapsis, rather to counteract the efficiency of the end-joining machineries themselves.

Two non-exclusive models conceal our data describing the role with the known roles of the cohesin complex (Figure 4). First, the cohesin complex, by maintaining the sister chromatids bonded together i) impairs the excision of the internal I-SceI fragment, and ii) limits the mobility of the distal DSEs (Figure 4A). Such model should acts only at a post-replication stage. Interestingly, it has been proposed that the cohesin complex constrains the mobility of spontaneous lesions in S-phase, in budding yeast (Dion et al., 2013). However, in human cells, depletion of SMC1 did not affect the mobility of a single DSB (Soutoglou et al., 2007). In the second model, the cohesin complex is load at the DSB leading to the formation of shorten chromatin loops that isolate one DSB per loop, and restricting the accessibility to DSEs from a different loop, in an insulator-like manner (Figure 4B). Cohesin forms DNA loops all along the cell cycle allowing replication origins firing and gene transcription regulation (Guillou et al., 2010, REF transcription). According our model, the absence of cohesin would generate larger loops accepting several DSBs. Such configuration should favor the excision of the I-SceI-internal fragment and the joining of the two distal ends present in a common loop (Figure 3E). In addition these large loops should also favor contact with DSBs from other enlarged loops, resulting in large-scale genome rearrangements such as translocations and chromosome fusions. According this DSBs Insulator Model (DIM), our data implies that the cohesin complex should be able to isolate two DSBs separate of only 3.2kb. Remarkably, ChIP experiments have shown that the recruitment of the cohesin complex at DSBs defines domains of a 2 kb mean

length (not more than 5 kb) surrounding the DSB (Caron et al., 2012), i.e. sizes highly consistent with the DIM between two DSB distant of only 3kb, such as those of our NHEJ substrate.

In conclusion, the cohesin complex is essential for genome stability maintenance through several parallel roles: it both favors SCE and represses the end-joining of distant ends, likely by constraining DNA motility and thus the synapsis of distant DSEs.

RAD21 protects against genome rearrangements involving long distances between the intra- as well as interchromosomes DSEs. In addition, we also show here that the cohesin complex is also able to repress end-joining of DNA ends distant of only 3.2kb, which is a short distance, at the nucleus scale. This underlines the precision and sensitivity of the cohesin complex against the end-joining of distant DSEs. Indeed, even with such distances (3.2kb) the joining of DNA ends can generate genetic instability associating deletions, insertions and complex rearrangements. It is thus tempting to speculate that the cohesin complex is involved in the protection against complex rearrangements such as the recently described chromotripsis .

The end-joining of distant ends is a crucial issue during replication. Indeed, Replication stress generates single double strand ends; the joining of such single ends systematically generates genome rearrangements. Remarkably, the cohesin complex protects against the expression of fragile sites [REF] and spontaneous chromosomes and chromatid breaks (see Figure 3), thus against the generation of DSEs. Therefore, the maintenance of genome stability should take advantage of the sister chromatid, which is identical, to resume the arrested replication forks and should repress the end-joining of distant ends. The cohesin complex favors sister chromatids exchanges (SCE) (Atienza et al., 2005, Bauerschmidt et al., 2010, Potts et al., 2006). We show here that, in parallel, it also represses the end-joining of distant ends. Importantly, it does not inhibit the repair of close ends, allowing the opportunity to repair DSB generated by other stress, such as for instance ionizing radiation, which generates close DESs.

Materials and methods

Cells and Transfection

The GC92 cell line (Rass et al., 2009) was derived from SV40-transformed GM639 human WT fibroblasts and contains the end-joining substrate pCOH-CD4 referred here as distal 3200bp CD4 (Guirouilh-Barbat et al., 2004). GCSH14 and GCS5 cell lines are derivate of GC92 and were obtained after substrates transfection and Neomycin selection (350 ug/ml). GCSH14 contains a homemade substrate named distal 3200 bp GFP. GCS5 contains already Scully lab described substrate named close 34 bp GFP in this study.

Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, and 200 IU/ml penicillin and incubated at 37°C in 5% CO2. I-SceI was expressed by the transient transfection of the cells with the expression plasmid pCMV-I-SceI (Liang et al., 1998). The expression of the hemagglutinin (HA)-tagged I-SceI was verified by western blotting using an anti-HA antibody (MMS-101R, Covance). The small interfering RNA (siRNA) sequences were as follows: siNT (Dharmacon "Smart pool''), siRAD21 A (5' GACCAAGGUUCCAUAUUAU 3') and siRAD21 SP (Dharmacon "Smart pool'' #L-006832). The siRNA complexes (used at a final concentration of 20nM) were incubated with the cells for 48 hr and removed prior to I-SceI transfection, as described above.

DNA Manipulations

Genomic DNA was extracted using NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Around 300ng of gDNA was taken to make repair junction PCR using primers CMV-6 (5'-TGGTGATGCGGTTTTGGC-3'), CD4-int (5'-GCTGCCCCAGAATCTTCCTCT-3') and Herculase II Polymerase (Agilent Technologies). The conditions for amplification were 95°C for 5min, 35 cycles at 95°C for 30 s, 62°C for 30 s and 72°C for 1min and final extension at 72°C for 5min. PCR products were purified with a Nucleospin extract II gel extraction kit (Macherey-Nagel). Purified PCR products were cloned with the Zero blunt PCR TOPO cloning kit (Invitrogen). Colonies were screened using CD4/CMV6 primers and PCR Master Mix (Thermo Scientific). Resulting PCR products were sent to GATC Company for sequencing.

Junction Sequence Analysis

Junction analyses in GC92 cells were performed as previously described using CodonCode Aligner or ApE software (Guirouilh-Barbat et *al*., 2004; Rass et *al*., 2009).

Metaphase spreading and analysis

The cells (GC92) were plated 24 hr prior to siRNA transfection and were grown for a further 72 hours. Aphidicolin was added to the culture medium for 6h at 0.3 uM, colcemid (Roche) was added during the final 3 hours to a final concentration of 0.1 mg/ml. For camptothecin treatment, cells were incubated 1h with 1uM, 4h with fresh medium and 2h with colcemid. Cells were fixed in an 1/3 acid acetic and 2/3 EtOH solution and kept at -20°C. Next day, we processed to metaphases spreading and FISH was performed 24h later. FAM-labeled centromere and Cy3-labeled C-rich telomere probes (Eurogentec) were used following manufacturer's instructions. Images were acquired on an Axio Imager Z1 microscope using the Axio Vision software (Zeiss) and analyzed with ImageJ software.

Statistical Analysis

Statistical analyses (Mann-Whitney tests) were performed using GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software).

Acknowledgments

This work was supported by funding from the Ligue Nationale Française contre le Cancer (équipe labellisée “LIGUE 2014”), ANR (Agence nationale de la recherche) and INCa (Institut National du Cancer). C.G was supported by fellowships from FRM. We thank Dr Bernheim, C. Dubois Gache and Dr. Fillippo Rosselli’s team for the support in cytogenetics, and Drs. E. Despras, P.L Kannouche for stimulating discussion.

Figure Legends

Figure 1. RAD21 or NIPBL depletion increases the efficiency of end-joining of distal but not of close double strand extremities

A. Intrachromosomal NHEJ substrates. Close GFP-34bp (in GCS5 cell line) and distal GFP-32OObp (in GCSH14 cell line) substrates allow the GFP (Green Fluorescent Protein) expression after end-joining of I-SceI induced DNA breaks separated by 34bp or 3200bp respectively and internal sequence deletion. In close GFP-34bp substrate, I-SceI sites flank a Kozac consensus sequence (KOZ) allowing an alternative initiation of the translation process and counteracting GFP expression. In distal GFP-3200bp substrate, before I-SceI expression, promoter and GFP gene are separated by H2Kd sequence allowing inhibition of GFP expression and H2Kd membrane expression. Both cell lines have another integrated substrate: CD4-3200bp allowing CD4 expression after I-SceI expression. GFP and CD4 expression are measured by flow cytometry. Grey arrows: I-SceI enzymatic site. **B.** RAD21 or NIPBL inhibition stimulates distal EJ and has no effect on proximal EJ. The normalized frequency of end-joining events (GFP+ or CD4+) after siRNA transfection and I-SceI expression is shown. Student's t-test: In GCS5 cell line, Distal CD4-3200bp: siNT versus siRAD21 SP, P<0.001, siNT vs. siRAD21 A, P=0.007, siNT vs siNIPBL, P=0,02, siNT vs siNIPBL + siRAD21, P=0,005. In GCSH14 cell line: *Distal GFP-3200bp*, siNT versus siRAD21-SP, P=0.0003; siNT vs. siRAD21-A, P=0.0274, siNT vs siNIPBL, P=0,0109, siNT vs siNIPBL+siRAD21, P=0.005, *Distal CD4-3200bp*: siNT versus siRAD21 SP, P<0.001, siNT vs. siRAD21 A, P=0.008, siNT vs siNIPBL, P=0,003, siNT vs siNIPBL + siRAD21, P=0,008. The values correspond to at least 3 independent experiments. SEM is represented.

Figure 2. RAD21 inhibits both C-NHEJ and A-EJ and prevents against large deletions and insertions at repair junctions. A. Normalized frequency of CD4+ cells measured by flow cytometry. Student's t-test: siNT versus siRAD21, P<0.0001; siNT versus siLigIV, P=0.019. The values correspond to at least 5 independent experiments. SEM is represented. **B.** pCOH-CD4 intrachromosomal substrate called Distal CD4-32OObp in this study and described in (Josée

Guirouilh-Barbat et al., 2007). I-SceI cleaves the two sites (black arrows) flanking H2Kd sequence, promoter and CD4 gene are joined by C-NHEJ or A-EJ mediated nucleotide deletions. **C.** Upon**:** Analysis of repair junctions upon RAD21 depletion, percentage of total sequences is shown. Bottom: Origins of insertions of each insertional sequence. Each sequence was identified using Basic Alignment Search Tool (BLAST) program. % of chromosomal capture insertion, insertions associated with deletions and insertions coupled to addition of non-templated nucleotides

Figure 3. RAD21 protects against chromosome rearrangements. A. Western blot of RAD21 silencing and Circos plot of genetic alterations after RAD21 silencing including intra- and inter-chromosomal translocations (black arrows), deletions (red circles), sequences duplication (blue circles), inversion (black circle) and insertions (green circles). Table: Number of events sequenced. **B.** Chromatid break, chromosome break and radial structures observed. **C.** Quantification of aberrations shown in (B). Fisher's test: chromatid breaks siNT versus siRAD21, $P<0.0001$, Radial structures siNT versus siRAD21, $P<0.0001$. **D.** Timeline of the siRNA depletion and APH treatment experiments depicted in panels (E-F). **E.** Examples of observed interchromosomal fusions after centromeres and telomeres labeled by PNA FISH. **F.** Quantification of events depicted in (a). At least 1000 chromosomes were count by conditions. Student's t-test: siNT + APH versus siRAD21 + APH, $P=0.0188$.

Figure 4. Models of distal en-joining inhibition by cohesin complex. A. Post-replicative model. In presence of cohesin complex, the internal fragment (in red) i.e. flanked by two DSBs, is maintained by cohesin complexes allowing end-joining between DSB ends raised of the same DSB. In absence of the complex, internal fragment deletion and the increase mobility of DSB ends allow end-joining of distal ends (black arrow). **B.** DSB isolation Model (DIM). In presence of cohesion complex, cohesin loading at DSB allow isolation of DSBs in two short loops and end-joining between DSB ends raised of the same DSB. In absence of cohesin complex, loops formation is compromised, leading to i) put both DSB in the same loop or ii) form bigger loops enable to strongly isolate DSB ends.

Supplemental Figure Legends

Figure S1. Sequences of the Resealed Junction (excision events) upon Silencing of RAD21, Related to Figure 2.

Figure S2. Circos plot annotations. Related to Figure 3B

Nature of events: translocation, deletion, insertion and duplication events are depicted including name and size of the gene altered. In case of translocation event, second gene and chromosome are depicted. Size of insertions and deletions are shown.

Figure S3: Fragile sites alterations in RAD21 depleted cells

Small deletions, insertions and single-nucleotide polymorphism found in fragile sites are shown. Size of deletions and insertions is between 1 and 30 nts. Quality (=Phred scale) is the probability that the polymorphism exists at this site given sequencing data. Because the Phred scale is -10 * log(1-p), a value of 10 indicates a 1 in 10 chance of error, while a 100 indicates a 1 in 10^10 chance.

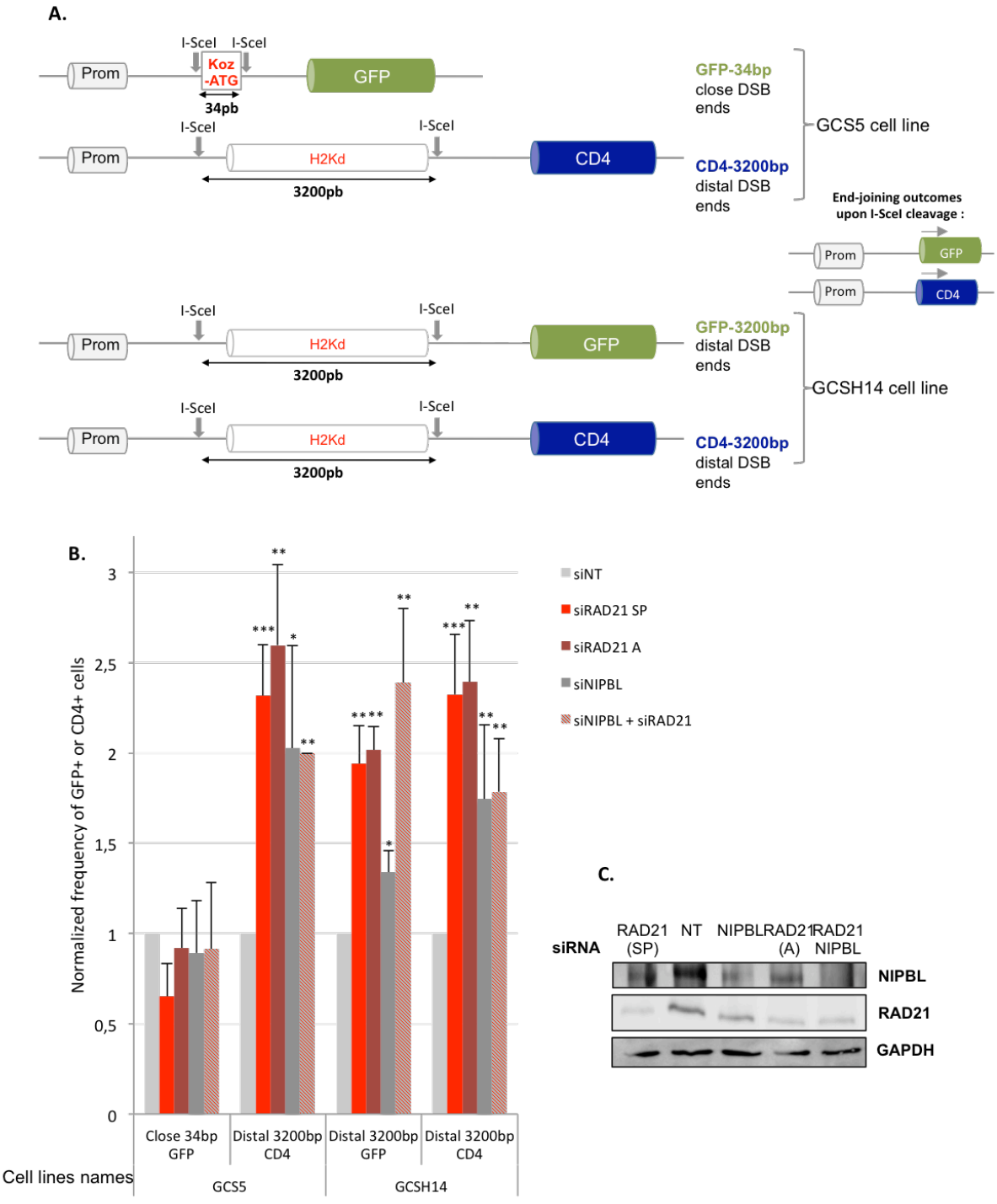
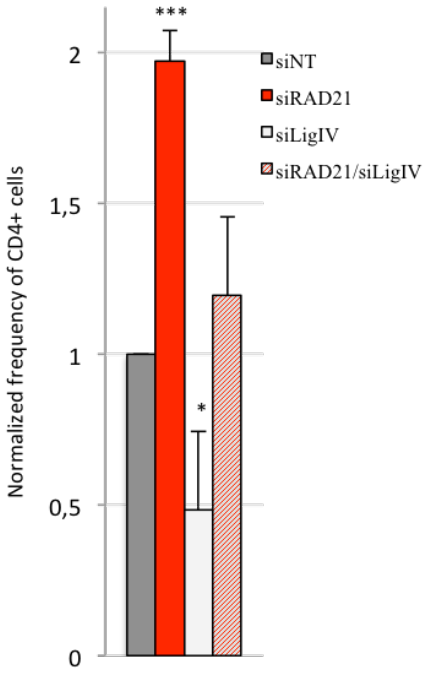
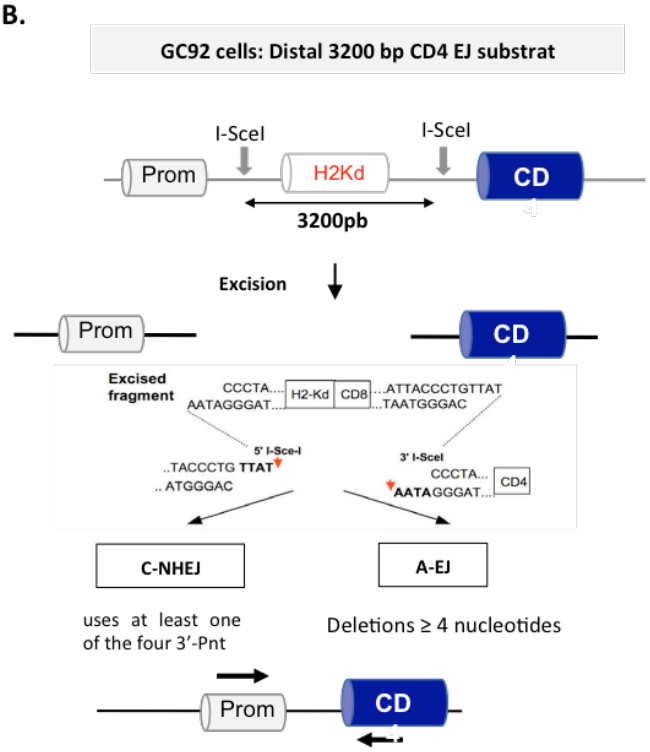


Figure 1 : Gelot C, et al.

A.



B.



C.

		siNT	siRAD21
Use of 3'Pnt (C-NHEJ)		**54.3%**	**50.5%**
Del of 3'Pnt (A-EJ)		**45.7%**	**49.5%**
Deletions	4 to 30 nts	78%	61%
	> 30 nts	22%	**39%**
Insertions	> 45 nts	6%	**13%**
Nb of sequences		127	93

D.

	Intrachromosomal substrate duplication	Chromosomal	Plasmid vector	Other	Mosaic sequences	% mosaic insertions	% Insertions with deletions
NT	3/8	3/8	1/8	1/8	1/8	25%	50%
RAD21	7/12	4/12		1/12	4/12	33%	75%

Figure 2 : Gelot C, et al.

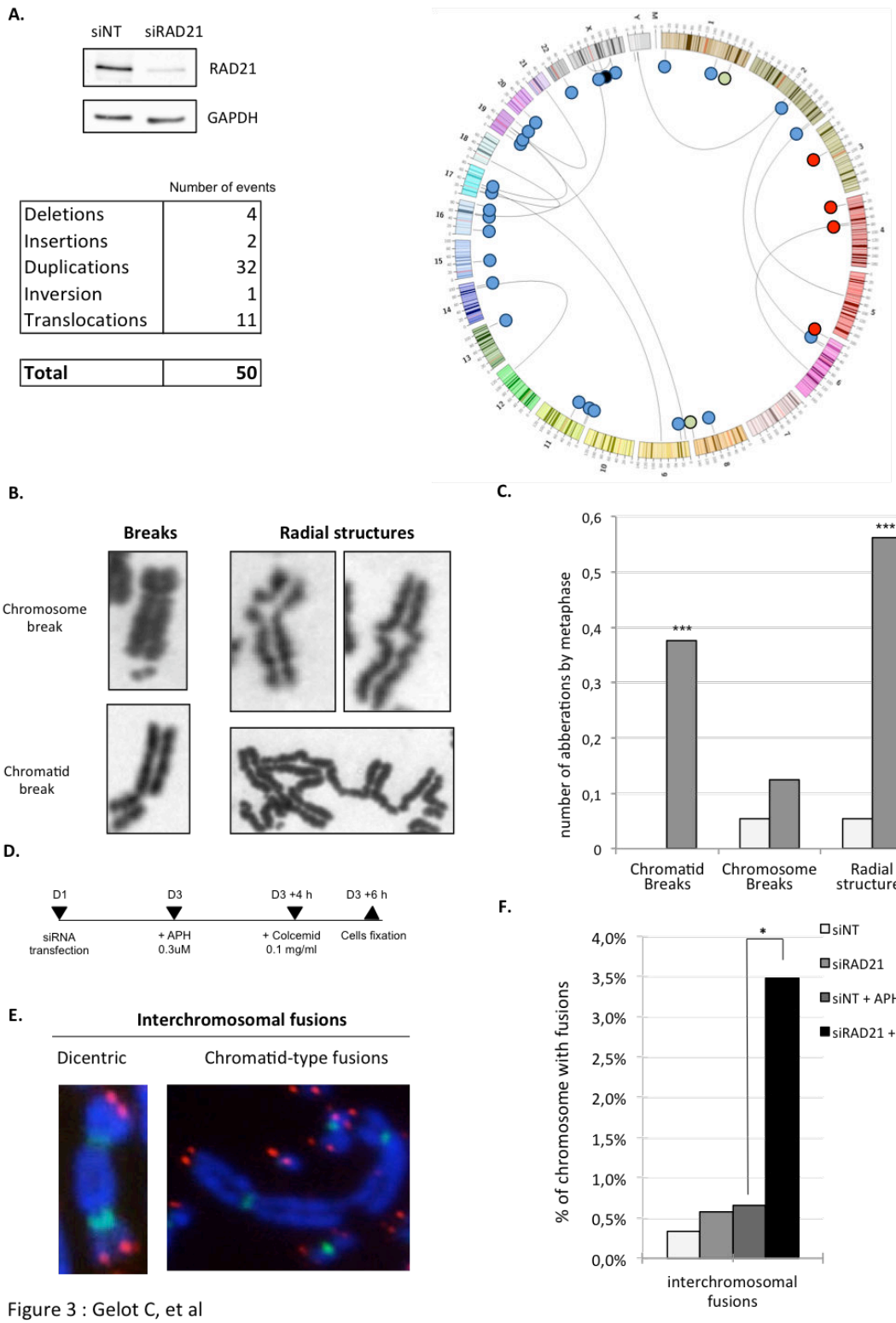


Figure 3 : Gelot C, et al

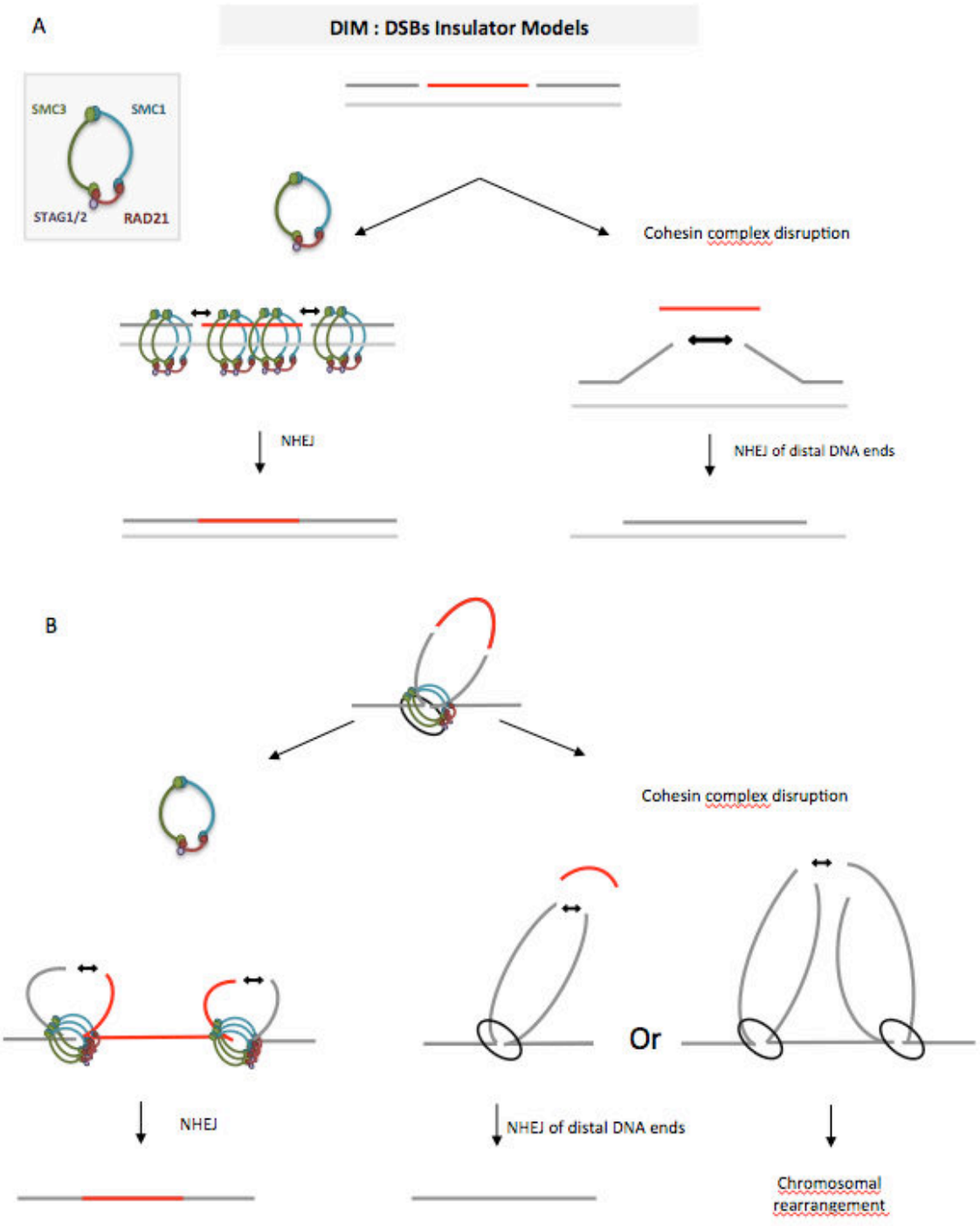


Figure 4 : Gelot C, et al

Table S1

si NT **Total sequences : 127**

Use of 3'-Pnt: **54.3% (69/127)**

40 clones: accurate repair (HIFI): 32.3%

CACGGAAGGA**ATTACCCTGTTATCCCTA**TCTAGATATGAAATCACG

23 clones: deletions on the 4 3'Pnt: 18.1%		**Size of deletion**
CACGGAAGGA**ATTACCCTGT**-**AT**CCCTA**TCTAGATATGAAATCACG**	x10	-1
CACGGAAGGA**ATTACCCTGTT**-**T**CCCTA**TCTAGATATGAAATCACG**	x1	-1
CACGGAAGGA**ATTACCCTGTT**--**CCCTA**TCTAGATATGAAATCACG	x3	-2
CACGGAAGGA**ATTACCCTG**--**ATCCCTA**TCTAGATATGAAATCACG	x5	-2
CACGGAAGGA**ATTACCCTG**------**CCCTA**TCTAGATATGAAATCACG	x2	-4
CACGGAAGGA**ATTACCCTGT**---**CCCTA**TCTAGATATGAAATCACG	x2	-3

2 clones: insertion without deletion <45 nts: 1.6%	**Size of insertion**
GGAAGGAATTACCCTGTT--T-ATCCCTATCTAGATATGAAATCACG	+1
GGAAGGAATTACCCTGTTA--TTA-TCCCTATCTAGATATGAAATCACG	+3

4 clones: insertion without deletion >45 nts: 3.1 %

GGAAGGAATTACCCTGTTA--CACTCCATTCCATTGTACTCCATTCC +127
ACTCCTTTCAATTGCATTCCATTTCATTTGATTCCATTCCATTCCATT
GTCTTCTACTCCACTCCACTCCATTCAATTCCTTTCCGTCTGATTCCA
TTCCT--TCCCTATCTAGATATGAAATC

Non-identified sequence

ACACGGAAGGAATTACCCTGTTATC--GGCCTCTGAGCTATTCCAGAA +148
GTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAA
CTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCGTGTT
CGACTCTGTGCGACCCCAGGGACGGGGGATC--CCTATCTAG

Intrachromosomal Substrate

AACACGGAAGGAATTACCCTGTTATCC--- GTTTCCCTCCCCCAACGTT +151
TTCTTTTACTTCTACTCACAGGAACTCCATATTTTCAGTGTTAAAGGCA
GTCCAGGAAATAACCCTCTGTATTAGTTTACAGATAGCTGTTAATGAA
TTAACAAGTTACTTTCCTTGGGATATTTGCAATCC---CTCTAGAGCA

Chromosome 1 (211271134 to 211271282, alternate assembly CHM1_1.1 database)

GGAAGGAATTACCCTGTTA--AATACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTG +160
CCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGATCTGACTTCT
GGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTT
TTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAT--TCCCTAT

I-SceI vector sequence

Deletions > 3'-Pnt: **45,7% (58/127)** **Size of deletion**

43 clones: deletion: 33.9%

CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC----TATCCCTATCTAGATATGAAA		-3
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGTTAT----TATCTAGATATGAAA		-3
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATT----------ATCCCTATCTAGATATGAAA		-5
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------CCCTATCTAGATATGAAA	x2	-5
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGTTA------TCTAGATATGAAA	x6	-6
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGTTA--------TAGATATGAAA		-7
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------TATCCCTATCTAGATATGAAA	x2	-8
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------ATCTAGATATGAAA	x6	-9
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAA----------TATCCCTATCTAGATATGAAA		-9
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------ATCTAGATATGAAA	x3	-9
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------ATCTAGATATGAAA	x6	-9
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTG----------TAGATATGAAA		-11
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATT----------CCCTATCTAGATATGAAA		-10
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACC----------TCTAGATATGAAA		-12
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAAGGAAT----------CCTATCTAGATATGAAA		-12
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGTTA----------TGAA		-14
CTCTAGAGCAACACGGA----------TATCCCTATCTAGATATGAAA		-14
CTCTAGAGCAACACGGAA----------TCTAGATATGAAA		-21
AGCTGGCTAGC---------- TAGATATGAAA		-39
CAACACG----------CCATGTAGTGTATT		-42
AAGCTGGCTAGCGC----------CATGTAGTGTA		-57
CTCTGGCTAACTAGA----------TATGAAATC		-101
TTTGACTCACGGGGATTTCC---------- TATCTAGATATGAAATCA	X2	-262

11 clones: deletion/insertion <45 nts: 8.7%

CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATT--CCCCTG--TATCCCTATCTAGATATGAAA	-6 +6
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGTTA--ATAG--TATGAAA	-11 +4
GAAT--AAGCTGAGATCGCGCCACTGTGCTCCAGCCTGGCG--ATCTAGATATGAAA	-11 +35
CTCTAGAGCAACACGGAAGGA--TATGATTTCA--TATCTAGATATGAAA	-11+10
GCAACACGGAAGGAATT--TCCTTCT—CTATCTAGATATGAA	-14 + 7
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATT--GACCTA--TTATCCCTATCTAGATATGAAA	-16+6
GCAACACGGA-----TTCA----TATCTAGATATGAAA	-20 +4
CTCTAGAGCAACACGGA--TATGA--AGATATGAAA	-21 +5
GCAACACG--CCATGTAGTGTAA--TGACCGATTCCT	-55 + 13
TTATCGAAAT--------AT-----CTATCTAGATATGAAA	-75 +2
ACACGGAAGGA --TAT—CGCTGGTGCTGGGGAAGGAA	-307 +3

4 clones: deletion/insertion >45 nts: 3.1%

GCAACAC--AAACTCTGTTTGTGAAGCCTGCCAGTGGATATTCGGACCTC -169 +258
TTTGAGGCCTTCGTTGGAAACGGGATTTCTTCATATTATGCTAGACAGAA
GATTTCTCAGTAACTTCTTTGTGTTGTGTGTATGCAACTCACAGAGTTCAA
CCTTCCTTTAGACAGAGCAGATTTGAAACACTCTTTTTGTGGAATTTGCAA
GTGGAGATTTCAAGCGCTTCGATGCCAATGGTAGAAAAGGAAATATCAGG
TTATTGTCTCATGAG--GAGTGAAGG

Repeat sequence: Chromosome 15 (41271761 to 41271998, alternate assembly HuRef)

GGACTTTCCAAAATGTC---GTTGGTGATGCGTTTTGGCAGTACATCAATG -193 +304
GGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT
TGACGTCAATGGGAATTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAA
AATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTA
CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCAC
TGCTTCCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGTGAGACCCAAGC
TGGCTACCGCTCTAGAGCAACAC---TCTAGATATGAAA

Intrachromosomal substrate sequence

TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTT--TCTTGGTGATGCGGTTTTGGCA -320 +324
GTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAATTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGG
GACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGG
TAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTA
GAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGG
GAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT
GTT--CCCTATCTAGAT

Intrachromosomal substrate sequence

TTGGTGATGCGGTTTTGGC--TCACTACAACCTCCGCCTCCCGGGTTCAAGTG -201 +467
ATTCTCCTGCCTCGGACTCCTGAGAGGCTGGGACTACAGGCACATGCCACGA
CACCCAGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACAGGGTTTCACCATGTTGGCC
AGACTGGTCTCGAATTCCTGACCTCAGGTGATCCGCCCGCCTCGGCCTCCCA
AAATGCTGGAATTATAGGCGTCAGCCACTGCGCCCTGCTAATGGACAACCTT
TAAACCTACATGTTTGGCTATTTCTTAGTATTTTAGGGTTGCTTCGTGCTCTGG
CCTGGGTTTGCAGGAAAAATGGGAGAGAAGAGGAGAAAAGGGCTGGAAGAG
GCTTGGCCATGGTAGAAGGCATGGGTGGGTGTGAGGAGAAGGAAACAGAGT
GATGGGCCAGCAAGGAGTCACAGGGTTTCGGGATCTGGGCTAGCGACCCTC
CTGGCCTCCAATGGGCTAA--CACGAAAAGAGGAATGCCTTATCCCC

Non-identified sequence / Chromosome 14 (75601884 to 75602260 alternate assembly CHM1_1.1)

si RAD21 **Total sequences : 93**

Use of 3'-Pnt: **50,5% (47/93)**

22 clones: accurate repair (HIFI): 23,7%

CACGGAAGGA**ATTACCCTGTTATCCCTA**TCTAGATATGAAATCACG

22 clones: deletions on the 4 3'Pnt: 25,8% **Size of deletion**

CACGGAAGGA**ATTACCCTGT-ATCCCTA**TCTAGATATGAAATCACG	x9	-1
CACGGAAGGA**ATTACCCTGTT-TCCCTA**TCTAGATATGAAATCACG		-1
CACGGAAGGA**ATTACCCTGTT--CCCTA**TCTAGATATGAAATCACG	x3	-2
CACGGAAGGA**ATTACCCTG--ATCCCTA**TCTAGATATGAAATCACG	x9	-2

3 clones: insertion without deletion >45 nts: 3.2 % **Size of insertion**

ACACGGAAGGAATTACCCTGTTAT--GCGCTCCAAATCTCCACTTGCA +89
CATTCCACAACAAGAGTGTTTCCAAACTGCTCTATCAATAGGAATGT
TCAACTCTGTGAGGTGAATG--CCCTATCTAGATATGAAATCACG

Repeat sequence: Human alpha satellite from the centromeric region DNA with 16 monomer tandem repeats

CAACACGGAAGGAATTACCCTGTT--CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATC +119
AAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC
AAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAT
--TATCCCTATCTAGATATGAAATC

Intrachromosomal substrate sequence

CAACACGGAAGGAATTACCCTGT--GTGGTATTTTTTACATGACTGCGT +153
ACATTTGTCAAAACTCATACCTAACTTAAAAGGTTAATTTTACTGTGT
GTATATTATACCTCAATAAACCTGACTTAATAAATAAAATCCACTAAT
GCCCTTCAACCATGGTTAACACATATCAAGCTA--TATCCCTATCTAGAT

Chromosome 12 (70552463 to 70552615, alternate assembly CHM1_1.1 database)

Deletions > 3'-Pnt: **49,5% (46/93)** **Size of deletion**

31 clones: deletion: 33,3%

CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT-TTATCCCTATCTAGATATGAAA		-1
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC---TATCCCTATCTAGATATGAAA		-3
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------CCTATCTAGATATGAAA	x2	-6
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACC----------TCCCTATCTAGATATGAAA		-6
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------TATCCCTATCTAGATATGAAA		-8
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC----------CTATCTAGATATGAAA		-8
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------ATCTAGATATGAAA	x6	-9
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATT----------TCCCTATCTAGATATGAAA		-9
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAAT----------CCCTATCTAGATATGAAA		-11
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCC----------TAGATATGAAA		-13
CTCTAGAGCACACGGAAGGAATTACCCTGT----------ATGAAA		-15
CTCTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCT----------ATATGAAA		-15
CTCTAGAGCAACACG----------TCTAGATATGAAA		-24
CTCTAGAGCAACACGGAAG----------ATATGAAA		-25

CTCTAGAGC----------CCCTATCTAGATATGAAA -25
CTGGCTAGCGCT----------TATCCCTATCTAGATATGAAA -30
TAGCGCTC----------CCTATCTAGATATGAAA x2 -32
TGGCTAGCGCTC----------CCTATCTAGATATGAAA -32
CTC----------TAGATATGAAA -38
CTCTAGAGCAACACGG----------CCATGT x2 -41
GCTAACTAG----------CTATCTAGATATGAAA -105
AATTAATACGACTCAC----------CCATTC -137
TGGCTAGCGCTC----------CTGTGCAAGAAGCAGAGTGA -155

6 clones: deletion/insertion <45 nts: 6,5%

AGAGCAACACGGAAGGAAT--CACGCTG--TATCCCTATCTAGATAT -8 +7

ACGGAAGGAATT--CCTT-CCTATCTAGATATGAAATCACGCCATG -11 +4

AACACGGAAGGA--TTCA--TATCTAGATATGAAATCACGCCATGTAG -16 +4

AGCGCTCTAGAGCAACACG--TGTTG--CTATCTAGATATGAAATCA -21 +5

CTCTAGAGCAACACGGAAG--AGA--ACGCCATGTAGTGTATTGACCG -35 + 3

CCAAGCTGGCTAGCGCTCTAG--CAAACTAAAAACCC--TATGAAATCAC -40 +14

9 clones: deletion/insertion >45 nts: 9,7%

CAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAACACGGAAG-TGTATTGACCATGTA -37+55
GTGTATTGGCCATGTAGTGTATTGGCCATGTAGTGTATTG-GCCATGTAG
TGTATTGACCGATTCCTTG

Non-identified Sequence

CTAGAGCAACACGGAAGGAATTACCCTGTTATC-TATCTATCTAG -2 +57
ATATGAAATCTATCTAGATATGAAATCTATCTAGATATGAAATCA
-TATCTAGATATGAAATCACGCC

3 small repeats of intrachromosomal substrate sequence

ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCGTGCAGGG -110 +96
TGCCATCGCACTGGTCGGCGATTAGCGACTTCTGAGTTCCGACGGATC
CGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACGCTAGCTAGGG-ATCCCTA
TCTAGATATGAAATCACGCCATGTAGTGT

Intrachromosomal substrate sequence

CACGGAAGGAATTACCCTGT--CCACTAAAAAATATTTTATCCCATAGA -16 +200
TTATTTGGAAATGTATTGCTTAGTTTCTAAACATGTATGCATTTCTAGT
TATCCTATTGTTACTAATTTCTAACTTAATTCCAATTCAGTCAGAGAAT
ATATTCTGCTGATTTCAATCTTTCAAAGTATATTCACTTCTTTTATGGTC
CAGAATGGTCAATTTTGGTAAATGT- TGAAATCACGCCATGTAGTGTAT
TGACCGATTCC

Repeat sequence: Chromosome 14 (54047568 to 54047767 alternate assembly CHM1_1.1 database)

GAAGGAATTACCCTGTTATC-AGGAAATGAGGCACCATGGAAGG -188 +203
GTTGTGAAAAAGAAAGTGACGTGGTCAGATTTGCAATTTAGGTA

AATCATTCAGGTGGTACCAGGTATGGATGCGAGGCAGGCAAGAC
TAGAAGCTGAGACCGCTTGGCTTGTTATGTAAGTTATTCTATAAG
ATGACTGCCTATTACAAATAGGTGTAAAAACCTCAGATACAACTA
TG--CAACAAGAGCTCAAGGAGACCACCATGTGCCG

Chromosome X sequence (44262930 to 44263060, alternate assembly CHM1_1.1 database)
Chromosome 7 sequence (85885870 to 85885942, alternate assembly CHM1_1.1 database)

AGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCAA-CACGGATGGGA -220 +275
AGATGATCTAGTATTCTGAATCCTTGTTAAAACCTGAGCCATGTATC
TCTAACTCCAGTGAAACTTGGTAGCTCTGATTCTACAGGGGAATTTG
TCAGAAAGAATCAGCTGACTTTACTGGCTTCCCCACTATGGGCTTAG
TCTTTGGCCTTTCCTAGTTTTCTAAGTGAACTGTTGTACCCCTCAAAA
CTCATGTCCCAACAATCATTTCTGATTACTCAGGATTCTACAGTTCAA
CTGCGTGGTTCTTCTGCTTTTAGCTGG -GCTCAAGGAGACCACCATGT

Chromosome 12 sequence (65367353 to 65367624, alternate assembly CHM1_1.1 database)

GGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTT-GACTCA -289 +288
CTTGGAGTTGCAAGTCTGCCAGCCCATCACTTCAAGTGGATAGCGT
TTTGACTCACGAGGATTTGCAAGTCTCCACAACATTGTCGCCAATG
CGAATCTGTTTCGCCACCAAACTCAACGCGACTTTGCAAAATGTT
GTATCTAATCAGACCCATCGGCGCAAATAGACAGTACGCGTCTAC
GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCATAGGGAGTAGCGA
ACCCGCTAGCGCTTGAGATCTCCAAGGAAGGAAGTCTCCCTATATG
GCGATCCAAAA—ATGAAATCACGCCATGTAGTGTAT

Non-identified sequence / intrachromosomal substrate sequence / non-identified sequence / intrachromosomal substrate sequence / non-identified sequence

GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATC-TTGGTGATGCGATAGTGGCTGT -301 +300
ACTTCAATGGATGTGCATATCTGCTTGACTCACACGGCAATGCAAG
TCTGCTCTG**CATTGACGTCAATGGGA**ATTTGTCATAGCGTCGTAAT
AACTGCGACTCTCCAAAACGTCGTAACAGCTGCCCTCCACTGTCGC
AAATGGACATAAGCAGAGTTCTGTGGCAGGTCAATG**TAAGCAGAG**
CTCTCTGGCTAATTAGAGATAACACGGCTCACTGTAGTGTGGAAC
AAAATGCGACTCGCTATAGGGAGACACAAAATGAATAGCGCTGTA
GACCA-ATCTAGATATGAAATCACGCCAT

Non-identified sequence / intrachromosomal substrate sequence / non-identified sequence / intrachromosomal substrate sequence / non-identified sequence

AAGCTGGCTAGCGCTCTAGAGCA-TGTAGTGTATTGACCGATTCCT -39 +365
TGCGGTCCGAATGGGCCGAACCCGGTCACCCATTCGAATTCGAGC
TCGCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGAGGCCTCATATACACTCACCTT
TGCAAGAAGCAGAGTGAAGGAAGGACTGCCCAGAGGCTCAGATT
CCCAATCAACAAGAGCTCATGTAGGCCACCATGTCCCGAGGCATC
TCTCTTAGGTGCTAGCAGCTGCTGCTCATGCAGCCATCTCAACTGT
AGGCGTTCACTCAAGGGAAGACATTGGTGCTGAGGAATGAAGGG
GAATCAGCAGAACTGCCCTGCGAGAGTTCCCAGAAGAAGATCACA
GTCTTCTCCTGGAAGTTCTCTGACCAGA-GAAATCACGCCATGTAG
TGTATTGACCG

Intrachromosomal substrate sequence

Supplementary data
S2. Circos plot

Chromosome 1	Gene name	Chromosome 2	Gene 2 name	Size of gene (bp)	Type	Nature	Size of deletion/insertion (bp)
chr12	CUX2	chr14	GALC	155846	INTER	TRANSLOCATION	
chr17	MAP2K3	chr18	LOC644669	2262	INTER	TRANSLOCATION	
chr2	PID1	chr5	CARTPT	1886	INTER	TRANSLOCATION	
chr2	NEB	chr6	HLA-DRA	5205	INTER	TRANSLOCATION	
chr16	LOC729159	chrX	FAM104B	18209	INTER	TRANSLOCATION	
chr9	PRUNE2	chr17	MYO1D	384656	INTER	TRANSLOCATION	
chr17	KRTAP4-9	chr19	SLC7A9	39269	INTER	TRANSLOCATION	
chr9	GLDC	chr19	SLC7A9	39269	INTER	TRANSLOCATION	
chr19	SLC7A9	chr21	MIR5009	100	INTER	TRANSLOCATION	
chr4	UGT2B4	chr6	CDK19	205981	INTER	TRANSLOCATION	
chr2	ANKRD30BL	chrY	FAM224A	26958	INTER	TRANSLOCATION	
chr3	MITF	chr3	MITF	228903	INTRA	DELETION	704
chr4	FBXL5	chr4	FBXL5	77296	INTRA	DELETION	2173
chr4	FBXL5	chr4	FBXL5	77 296	INTRA	DELETION	2361
chr6	PRPF4B	chr6	PRPF4B	43717	INTRA	DELETION	576
chr1	TRAF3IP3	chr1	TRAF3IP3	26292	INTRA	INSERTION	817
chr8	ZFP41	chr8	ZFP41	15885	INTRA	INSERTION	122
chr1	NPPB	chr1	NPPB	1472	INTRA	DUPLICATION	
chr1	LOC400794	chr1	LOC400794	105 315	INTRA	DUPLICATION	
chr11	MUC5B	chr11	MUC5B	39112	INTRA	DUPLICATION	
chr11	MUC5B	chr11	MUC5B	39112	INTRA	DUPLICATION	
chr11	MTCH2	chr11	MTCH2	25349	INTRA	DUPLICATION	
chr11	HBD	chr11	HBD	2693	INTRA	DUPLICATION	
chr13	METTL21C	chr13	METTL21C	8761	INTRA	DUPLICATION	
chr14	LGMN	chr14	LGMN	44896	INTRA	DUPLICATION	
chr15	DISP2	chr15	DISP2	12824	INTRA	DUPLICATION	
chr16	PARN	chr16	PARN	197028	INTRA	DUPLICATION	
chr16	JPH3	chr16	JPH3	96322	INTRA	DUPLICATION	
chr17	SLC5A10	chr17	SLC5A10	72251	INTRA	DUPLICATION	
chr17	MYO1D	chr17	MYO1D	384656	INTRA	DUPLICATION	
chr19	ZNF254	chr19	ZNF254	96379	INTRA	DUPLICATION	
chr19	CEP89	chr19	CEP89	92996	INTRA	DUPLICATION	
chr19	SSC5D	chr19	SSC5D	30696	INTRA	DUPLICATION	
chr19	MUC16	chr19	MUC16	132499	INTRA	DUPLICATION	
chr2	ANKRD30BL	chr2	ANKRD30BL	110379	INTRA	DUPLICATION	
chr2	ANKRD30BL	chr2	ANKRD30BL	110379	INTRA	DUPLICATION	
chr2	ANKRD30BL	chr2	ANKRD30BL	110379	INTRA	DUPLICATION	
chr2	ARL4C	chr2	ARL4C	8761	INTRA	DUPLICATION	
chr20	SLC24A3	chr20	SLC24A3	510292	INTRA	DUPLICATION	
chr22	MIAT	chr22	MIAT	30050	INTRA	DUPLICATION	
chr4	EREG	chr4	EREG	23618	INTRA	DUPLICATION	
chr6	BTN2A1	chr6	BTN2A1	187	INTRA	DUPLICATION	
chr8	SNX16	chr8	SNX16	43286	INTRA	DUPLICATION	
chr9	MLLT3	chr9	MLLT3	28088	INTRA	DUPLICATION	
chrX	IRS4	chrX	IRS4	3940	INTRA	DUPLICATION	
chrX	TTC3P1	chrX	TTC3P1	6377	INTRA	DUPLICATION	
chrY	TTTY23	chrY	TTTY23	1165	INTRA	DUPLICATION	
chrY	FAM224B	chrY	FAM224B	26955	INTRA	DUPLICATION	
chr16	CCDC135	chr16	CNGB1	88777	INTRA	DUPLICATION	
chrX	TSPAN7	chrX	IRS4	3940	INTRA	INVERSION	

Figure S2 : Gelot C, et al

Supplementary data
S3. Fragile sites

Quality	Chromosome	ChangeType	GENE	Associated Fragile sites
1023.21	3	DEL	ROBO1	FRA3R
6234.9	2	DEL	MBD5	FRA2S
330.88	X	DEL	ARHGAP6	FRAXB
145.49	13	DEL	GPC6	FRA13H
82.08	X	DEL	*Mageb18*	XqC1
396.43	2	DEL	IL1A	FRAXC
245.35	7	DEL	FOXP2	FRA7K
145,49	13	DEL	GPC6	FRA13H
288.35	9	DEL	PALM2-AKAP2	FRA9E/B
166,14	9	DEL		
288.35	9	DEL	PALM2	FRA9E/B
1136.37	3	INS	IL1RAP	FRAXC
14061.31	7	INS	CNTNAP2	FRA7I
1660.86	1	INS	USH2A	FRA1H
1020.12	1	SNP		
286.96	1	SNP		
63.91	11	SNP	DLG2	FRA11F
38.2	11	SNP		
1540.46	11	SNP		
289.03	2	SNP	LRP1B	FRA2F
108.9	5	SNP	PDE4D	FRA5H
438.31	3	SNP	LPP	FRA3P
85.04	3	SNP	ROBO2	FRA3R
787.32	12	SNP	PDE3A	FRA12G
518.95	1	SNP	ESRRG	FRA1H
48.94	7	SNP	DOCK4	FRA7G cen
242.33	3	SNP	FRMD4B	FRAXB

Figure S3 : Gelot C, et al

Résumé de l'article 1

Dans l'article 1, nous avons utilisé des lignées cellulaires possèdant des substrats intrachromosomiques afin de mesurer le EJ d'extrémités proches (34pb) ou éloignées (3200pb). Nous avons mis en évidence l'existence d'une régulation du EJ d'extrémités distales (3200bp) médiée par les cohésines. En absence de RAD21 ou de NIPBL, le EJ d'extrémités distales est augmenté de deux fois. Cette augmentation est indépendante du locus d'insertion du substrat intrachromosomique (plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées) et du gène rapporteur de l'efficacité d'EJ (CD4 ou GFP) (figure1). L'EJ d'extrémités proches (34pb) n'est pas affecté.

De plus, le niveau d'EJ observé suite à l'inhibition conjointe de la ligase IV et de RAD21 (figure 2A) et l'analyse des jonctions en absence de RAD21 (figure 2C) reflètent l'inhibition du C-NHEJ et de l'A-EJ d'extrémités distales par RAD21, ce qui suggére que la déplétion en cohésines n'affecte pas le recrutement de la machinerie de réparation par EJ *per se* mais jouerait sur la mobilité des extrémités distales ; le complexe inhiberait le rapprochement des extrémités prélude à leur ligature.

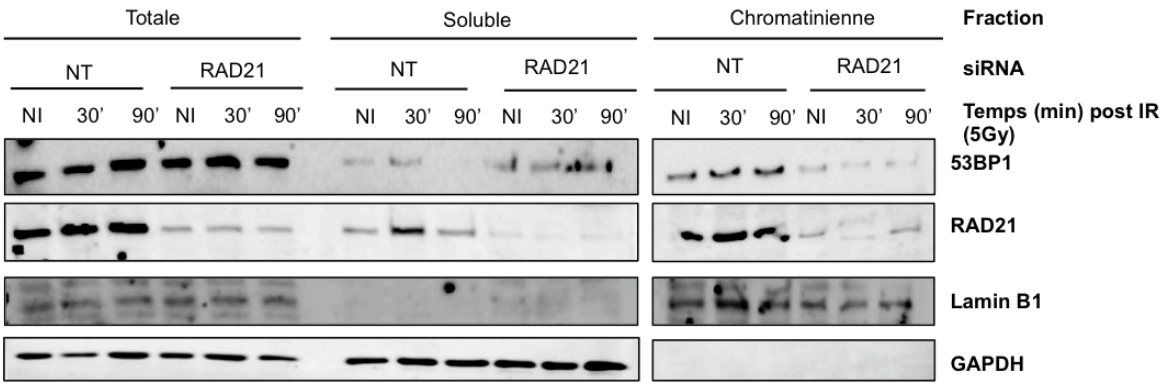
L'analyse des jonctions de réparation a également démontré un taux de réarrangements (insertions et grandes délétions) plus important en absence de RAD21. Nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition du EJ distal par les cohésines limitait le taux de réarrangements à l'échelle du génome. Nous avons donc effectué un séquençage de l'exome de cellules déplétées ou non pour RAD21. L'analyse de l'exome, effectuée 72h après transfection d'un siARN *RAD21* a démontré que des réarrangements de type translocation, délétion, duplication et insertion avaient lieu sur l'ensemble du génome (de sa partie codante) en absence des cohésines (figure 3A). Il y a également formation de nombreuses cassures chromatidiennes et chromosomiques ainsi que de figures radiales (figures 3B et 3C). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle crucial des cohésines dans la protection de l'intégrité du génome à petite (3,2kb) et grande échelle (exome).

Un stress réplicatif génére des extrémités distales dont la ligature aboutit à des réarrangements chromosomiques. Afin de maintenir la stabilité du génome, les CDB générées durant la réplication devraient préférentiellement être réparées par RH, la chromatide sœur étant présente, et l'EJ d'extrémités distales inhibé. Après génération d'un stress réplicatif par ajout d'aphidilcoline, l'inhibition de RAD21 mène à la formation de fusions interchromosomiques (figure 3E, 3F et 3G). Nous démontrons qu'en plus de son rôle dans la SCE, le complexe de cohésion inhibe spécifiquement l'EJ d'extrémités distales de CDB générées suite à un stress réplicatif.

Dés lors, deux modéles non exclusifs d'isolation des casssures sont possibles (figure 4). L'un est strictement post-réplicatif : le maintien des chromatides sœurs par le complexe de cohésion limiterait la mobilité des extrémités et donc leur ligature par EJ. Le deuxième est basé sur la formation de boucles de chromatine par les cohésines tout au long du cycle cellulaire ; les cohésines recrutées aux CDB joueraient un rôle insulateur, elles isoleraient les CDB au sein de boucles chromatidiennes limitant ainsi la mobilité des extrémités et leur prise en charge par l'EJ.

Résultats complémentaires (article 1)

A.



B.

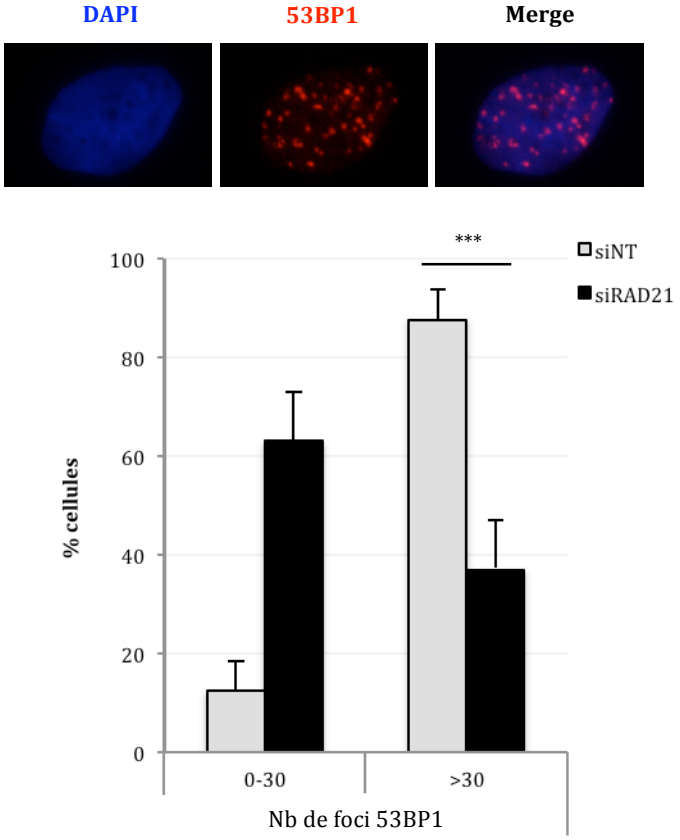


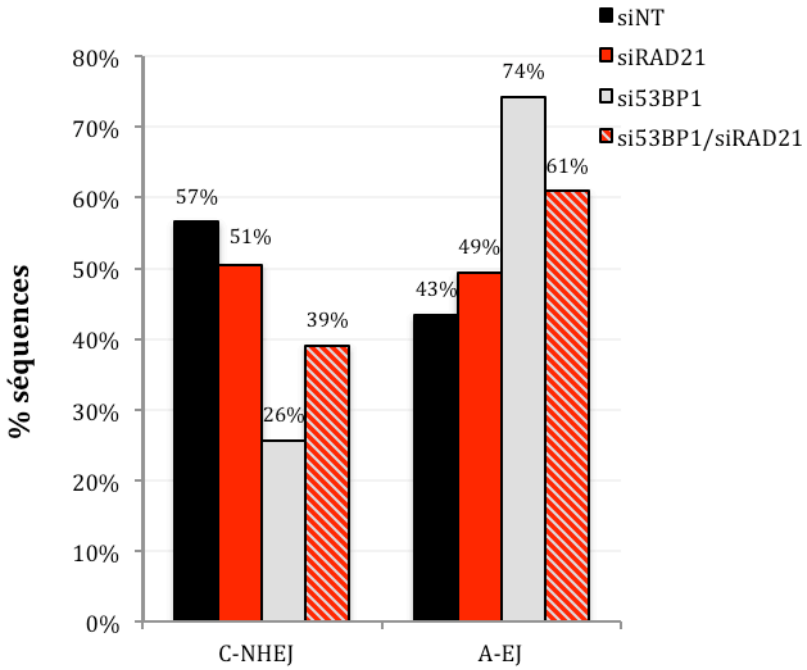
Figure 12 : Altération du recrutement de 53BP1 en absence de RAD21

(a) A différents temps après irradiation (5Gy), les cellules (GC92) ont été fractionnées et les fractions solubles et chromatiniennes ont été analysées par western blot. La lamin B1 et la GAPDH ont été blottés comme contrôles respectifs des fractions chromatinienne et soluble.

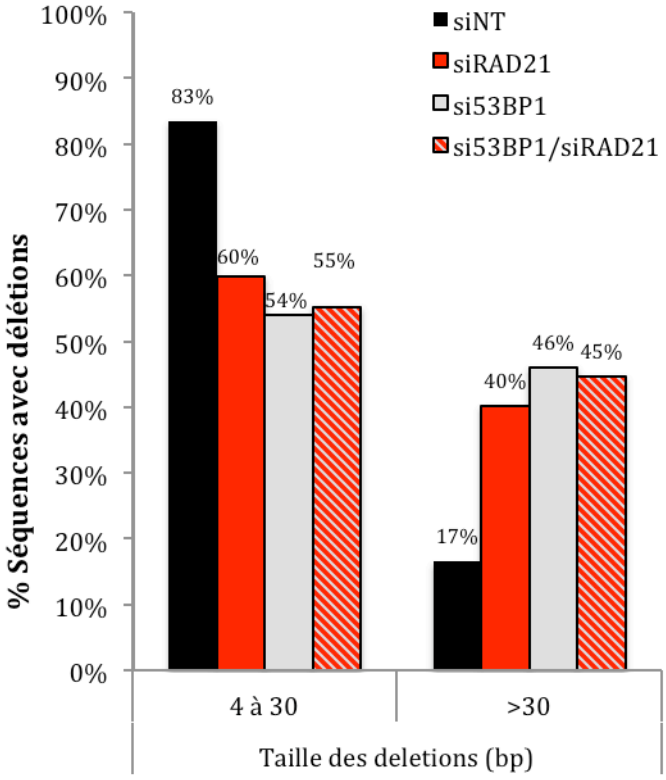
(b) Quantification des foyers 53BP1 observés par immunofluorescence après irradiation des cellules à 5Gy extraction des protéines solubles et fixation 1h post-

irradiation. Au moins 100 noyaux ont été comptés par expérience, 3 expériences tot

A.



B.



<u>Figure 13 :</u> Analyse des jonctions de réparation d'extrémités distales (3200 pb) après déplétion combinée de 53BP1 et RAD21

(a) Taux de C-NHEJ et A-EJ observés.
(b) Taille des délétions nucléotidiques aux jonctions de réparation

La moyenne de deux expériences est représentée. Au moins 50 séquences ont été analysées pour chaque point.

Distance between DNA double strand ends favors alternative end joining and CtIP-mediated complex insertions, at repair junction

Josée Guirouilh-Barbat[1], Camille Gelot[1], Anyong Xie[2], Ralph Scully[2] and Bernard S. Lopez[1]*

[1]Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, CNRS UMR 8200 and Université Paris Sud, Equipe labélisée "LIGUE 2014", 114, Rue Edouard Vaillant, 94805 VILLEJUIF. [2]Department of Medicine, Harvard Medical School and Beth Israel Deaconess Medical Center, 330 Brookline Avenue, Boston, MA 02215.

*Corresponding author

ABSTRACT

DNA double strand breaks (DSB) are very harmful lesions that can generate genomic rearrangements. In this study we focused on the End joining events occurring on close ends (separated by 34nt) vs. distal DSB (separated by 3200nt) using I-SceI induced DSBs in intrachromosomal substrates, in human fibroblasts.

Our data show that global end-joining is more efficient on close ends (34bp) compared to distal ends (3200bp) and that C-NHEJ is favored on close ends, resulting in more accurate outcome, compared to distal ends where more mutagenic A-EJ events takes place. In addition, the joining of distal ends favors the insertion/capture of DNA sequences.

In contrast with a putative role in the migration of distant double strand ends (DSEs), 53BP1 did not affect the efficiency of end-joining according the distance between the DSEs. Nevertheless 53BP1 protects against A-EJ repair of both close and distal ends, but restrains long deletions only on distal ends. In contrast, RIF1 protects against long deletions on both distal and close ends, revealing a separation of functions between 53BP1 and RIF1 for the protection against long deletions. Therefore, long deletions are CtIP-dependent (and counteracted by 53BP1) on distal ends but not on close ends. Finally, distance between the I-SceI sites favors CtIP-mediated complex rearranged insertions/capture of mosaic sequences from different chromosomes and53BP1 and RIF1 protects against such complex events at the repair junction. These data show only few kb distances between two DSEs (which is very short to the nucleus scale) are sufficient to jeopardize DSB repair efficiency and accuracy, leading to complex scars at the re-sealed junctions, and cell response is sufficiently sensitive to differently process such distal ends.

INTRODUCTION

DNA double strand breaks (DSBs) are highly toxic that can cause profound genome rearrangements and/or cell death. Faithful DSB repair is vital for cell survival and the maintenance of genome stability, but it should also allow genetic diversity in essential physiological process such as, for instance, the establishment of the immune repertoire. Thus DSB repair should be tightly controlled. There are two levels of genetic modification through DSB repair: 1- the rearrangement/joining of distant DNA sequences and 2- mutagenesis at the sealed junction.

In mammalian cells, end-joining of two DNA double strand ends (DSE) is a prominent DSB repair pathway(s). The canonical non-homologous end-joining (C-NHEJ), which is KU-Ligase 4 dependent, is able to join DSEs in a conservative way at the repair junction, although it is adaptable to imperfect cohesive ends (Budman et al., 2007). Recently, an alternative end-joining (A-EJ) pathway has been described that, like C-NHEJ, does not require sequence homology, but is initiated by CtIP-dependent single strand DNA resection (Guirouilh-Barbat et al., 2007, Bennardo et al., 2008, Xie et al., 2009, Deriano el al., 2009, Rass et al., 2009). Therefore, A-EJ is highly mutagenic at the repair junction, typically generating deletions resulting from the initial resection, and frequently using microhomologies distant from the DSB (Guirouilh-Barbat et al., 2007, Grabarz et al., 2012).

On one DSB, i.e. with two close ends, it has been proposed that C-NHEJ components tether the two ends immediately allowing their ligation (Cary et al., 1997, Weterings & Van Gent, 2004, Shao et al., 2012). When the two DSEs are distant, they should be first brought together, in a synaptic step, to allow their joining, inexorably generating genome rearrangements. The distance between the DSEs, which can give access to DNA ends modification process(es), in association with the time requires to complete the synapsis constitute a “spatio-temporal” gap that might increase the risks of DSEs alteration resulting in a mutagenic outcome at the repair junction. Remarkably, C-NHEJ-defective cells exhibit strong chromosome instability, underlying the fact that C-NHEJ is essential for the maintenance of genome stability (Guirouilh-Barbat et al., 2004). Along these lines, C-NHEJ protects against the mobility of DNA ends, thus preventing unscheduled rearrangements (Soutoglou et al., 2007, Yan et al., 2007, Boboila et al., 2013). Conversely, A-EJ is involved in chromosome translocation in mouse, drosophila and yeast cells (McVey et al., 2004, Weinstock et al., 2007, Simsek & Jasin, 2010). However, the situation appears to be more complex since C-NHEJ has also been

involved in genome rearrangements events such as capture of excised chromosomal sequences and translocation (Guirouilh-Barbat et al., 2004, Piganeau et al., 2013). Remarkably, 53BP1, which counteracts resection, therefore favoring C-NHEJ (Bunting et al., 2010, Bouwman et al., 2010, Grabarz et al., 2013), has been proposed to be involved in the synapsis of intrachromosomal distant DNA ends in the course of CSR and V(D)J, or in interchromosomal fusion of unprotected telomeres, in mouse (Reina-San-Martin et al., 2007, Difilippantonio et al., 2008, Dimitrova et al., 2008, Bothmer et al., 2010). However, contradicting these conclusions, the mobility of DSBs is not affected in 53BP1-deficient human cells (Krawczyk et al., 2012). Moreover, the ablation of 53BP1 affects neither the rearrangements between proximal (1,2 kb) or very distal DSBs (27 Mb) nor the IgH/Myc the translocation (Ramiro et al., 2006, Bothmer et al., 2011). Nevertheless, both C-NHEJ and A-EJ, in addition to other mechanism(s), have been proposed to be involved in chromothripsis, which result into complex chromosome rearrangements in tumors cells (Stephens et al., 2011, Maher & Wilson, 2012).

Here we address the question of the impact of the distance between two DNA ends on both the efficiency and the accuracy of end joining, which reflects the competition C-NHEJ *versus* A-EJ (Guirouilh-Barbat et al., 2007, Grabarz et al., 2013), and the impact of 53BP1, RIF1 *versus* CtIP. In order to analyze these processes at a precise molecular level and in the chromosome context, we used several intrachromosomal substrates monitoring the end Joining induced by DSBs targeted into the substrates by the meganuclease I-SceI. These substrates have been previously extensively characterized and validated (Guirouilh-Barbat et al., 2004, Guirouilh-Barbat et al., 2007, Grabarz et al., 2013, Beck et al., 2014). Noteworthy, the NHEJ substrates described in Figure 1 allowed us to extensively characterize A-EJ at the nucleotide level in a chromosomal context within living cells (Guirouilh-Barbat et al., 2004, Guirouilh-Barbat et al., 2007, Grabarz et al., 2013). In these substrates the two I-SceI cleavage sites were distant either of only 34bp or 3200bp. In addition, from these substrates we derived new substrates in order to monitor end joining with comparable substrate backbones. 34 bp in between the two DSEs is structurally comparable to one double-ended DSB, while 3200bp between the two DSEs requires the two ends to be brought together (synapsis) prior ligation. 3200bp distance between the two DSE is long, at the nucleotide level, but is short at the whole genome scale. More particularly, it is much shorter than the 27 Mb distance used in the

previous report (Bothmer et al., 2011), in which failed no impact of 53BP1 in the joining of such distant ends was observed. Thus one question here is to determine whether 53BP1 might act in the synapsis of DSEs separated of a much shorter distance, and whether cell response is sensitive enough to distinguish two DSEs only few kb apart and to process them differently compared to adjacent DSEs (34bp *versus* 3200 bp apart). More specifically, we also addressed the impact of CtIP, which initiates A-EJ and long resections on distal ends (Grabarz et al., 2013), and the antagonist protective effects of 53BP1 and RIF1, on close (34bp) *versus* distant (3200bp) ends.

MATERIAL AND METHODS

DNA manipulations. All DNA manipulations were performed as previously described (Ausubel et al., 1999).

Cells. The cell lines were derived from SV40-transformed GM639 human fibroblasts and were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mM glutamine, and were incubated at 37°C in 5% CO_2. Linearized NHEJ reporters were electroporated into the cells, and individual clones were selected using blasticidin (5 µg/mL), or neomycin (500 µg/ml).

Transfection. The meganuclease, I-SceI, was expressed by transient transfection of the expression plasmid, pCMV-HA-I-SceI (47) with Jet-PEI, following the manufacturer's instructions (Polyplus transfection, Illkirch, France). The expression of HA-tagged I-SceI was verified by western blotting. For 53BP1 silencing experiments, 50,000 cells were seeded 1 day before transfection, which was carried out using 20 nmol of onTarget plus SMARTpool for human TP53BP1 (Dharmacon, Chicago, IL, USA) and/or RIF1 siRNA (5'- GCUCUAUUGUUAGGUCCCAUUCU-3'), and/or CtIP siRNA (5'- GCUAAAACAGGAACGAAUC -3') and INTERFERin following the manufacturer's instructions (Polyplus Transfection, Illkirch, France). Forty-eight hours later, the cells were transfected with the pCMV-HA-I-SceI expression plasmid.

Western blotting. For western blot analysis, the cells were lysed in buffer containing 20 mM Tris HCl (pH 7.5), 1 mM Na_2EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1% (w/v) NP40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 sodium pyrophosphate, 1 mM b-glycerophosphate, 1 mM NA_3VO_4 and 1 µg/ml leupeptin supplemented with Complete mini protease inhibitor (Roche, Mannheim, Germany). Denatured proteins (20-40 µg) were electrophoresed in precast 10% SDS-PAGE or 4-8% Tris-acetate gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with the specific antibodies anti-HA (MMS-101R, Covance, Berkeley, CA), anti-53BP1 (#4937, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti RIF1 (#A300-569, Bethyl Laboratories), anti-CtIP (rabbit,

courtesy of Dr. R. Baer). Immunoreactivity was visualized using an enhanced chemiluminescence detection kit (EZ-ECL, Biological Industries).

FACS analysis. After transfection with the pCMV-HA-I-SceI plasmid and incubation for 72 hours, the cells were collected in PBS and 50 mM EDTA, pelleted and fixed with 2% paraformaldehyde for 20 minutes. The percentage of GFP-expressing cells was scored by FACS analysis using a FACScalibur instrument (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). The percentage of CD4-expressing cells was measured after incubation for 45 minutes with 2 µl of anti-CD4 antibody coupled to Alexa 647 (rat isotype, RM4-5, Pharmingen, San Diego, CA, USA).

Junction sequence analysis. We amplified the junction sequences by PCR of genomic DNA using the primers, CMV-6 (5'-TGGTGATGCGGTTTTGGC-3') and CD4-int (5'-GCTGCCCCAGAATCTTCCTCT-3'). The PCR products were cloned with the TOPO PCR cloning kit (Invitrogen Life Technologies) and sequenced (GATC Biotech, Konstanz, Germany).

RESULTS

The distance between the DNA ends affects the efficiency of end-joining. We first used substrates already designed in our two laboratories, CD4-3200bp (described before as pCOH-CD4) and GFP-34bp (described before as sGEJ) (Xie et al., 2009). One important difference between these two substrates is the distance between the two I-SceI sites: 3200bp in the CD4-3200bp and only 34bp in the GFP-34bp (Figure 1A). Another major difference is the distance between the 3' I-SceI site and the ATG of the reporter gene: 211bp in the CD4-3200bp and only 17bp in the GFP-34bp. Therefore, the CD4-3200bp substrate monitors both C-NHEJ and A-EJ even with large deletions, when the GFP-34bp only monitors C-NHEJ and A-EJ with very small deletion (<17bp). To analyze DSB repair with comparable substrates backbones, we constructed hybrid substrates, CD4-34bp and GFP-3200bp interchanging the internal sequences flanked by the I-SceI sites (Figure1A). We established several stable cell lines of these substrates in SV40-immortalized human fibroblasts (Figure 1B).

Remarkably, for a given substrate, the frequency of end-joining after I-SceI expression, did not significantly varied from one clone to the other, revealing an absence of position effect. In addition the nature of the reporter gene, GFP or CD4 did not influence the monitoring of the efficiency of end Joining (Figure 1B). Actually, the efficiency of global end-joining was only affected by the distance between the two I-SceI sites. Indeed, in the different clones analyzed, the efficiency of joining was 3.5-fold higher with the both close ends substrates (GFP-34bp as well as CD4-34bp) compared to both distal ends substrates (GFP-3200bp as wll as CD4-3200bp).

Taken together these results show that the joining of proximal DSB (34bp) is more efficient than the rejoining of distant DSBs (here 3200bp), whatever the reporters used here and the insertion locus.

The distance between DNA ends affects the accuracy of end-joining. We then investigated whether the distance between the DNA ends affected the fidelity of rejoining. The joining of double strand ends can be performed by the conservative C-NHEJ (KU80/70 and XRCC4-dependent) or by the error-prone A-EJ. Indeed, using this CD4-based substrate, we have previously characterized that C-NHEJ uses at least one of the 3' protruding nucleotides (3'Pnt) generated by the I-SceI cleavage,

while, in contrast, the A-EJ pathway systematically deletes the four 3'-protruding nucleotides (3'-Pnt) generated by the cleavage by I-SceI, resulting in a mutagenic DSB repair (Guirouilh-Barbat et al., 2004, Guirouilh-Barbat et al., 2007, Rass et al., 2009, Bétermier et al., 2014).

To investigate the balance between C-NHEJ and A-EJ according the distance between the two DNA ends, we sequenced the repair junctions on the CD4 reporters, CD4-3200bp and CD4-34bp. Interestingly; the DSB repair was more conservative on close compared to distal ends. Indeed the use of the 3'Pnt was more frequent on the CD4-34bp compared to CD4-3200bp (Figure 2B). Reciprocally, the frequency of deletions was higher on the CD4-3200bp than on the CD4-34bp (Figure 2B and supplementary data S1 and S2). These data support the conclusion that close ends preferentially used C-NHEJ, while increasing the distance between the DSB favors a shift towards A-EJ. Nevertheless, the distance between the I-SceI site did not affect the microhomologies usage, among the deletion events (A-EJ). Surprisingly, although global frequency of mutagenic events were less frequent on close ends, extended deletion (>100bp) were 2.8 more frequent on close ends compared to distal ends, among the mutagenic events. Finally, the frequency of insertions was strikingly increased with distal compared to close ends (Figure 2B).

Altogether these results show that repair of close DSEs (34bp) is not only more efficient but also more conservative than the repair of distal ends (3200bp), which favor not only A-EJ leading to deletion, but also insertions. However, the two types of ends should be processed by different machinery since protection against resection appears to be more efficient with distant ends compared to close ends. These data show that few kb separating the DSBs, are sufficient processed them differently from close DSEs.

53BP1 does not impact the efficiency of end-joining of distal ends. 53BP1 has been involved in the joining of distant double strand ends during CSR, V(D)J or unprotected telomere fusion (Ward et al., 2004, Reina-San-Martin et al., 2007, Dimitrova et al., 2008, Difilippantonio et al., 2008) but not with other systems nor others distances (1.2 kb and 27 Mb) (Bothmer et al., 2011). It should be pointed out that the distances between DNA ends in these situations are of much higher order of magnitude compared to the distance analyzed here (3200bp). However, since the rejoining of 3200bp-separated

ends still requires synapsis prior rejoining, when two 34bp-separated ends are sufficiently close to promote direct tethering and ligation, and since they are differently processed (see above), we tested whether 53BP1 depletion could differentially affect the end Joining according the distance between the two I-SceI cleavage sites.

With both CD4-based reporters (CD4-34bp as well as CD4-3200bp), 53BP1 depletion had no impact on the efficiency of the rejoining of DSEs whatever the distance (Figure 3A, pink plots), showing that 53BP1 did not favor the efficiency of the end Joining of distant ends, contradicting thus any putative role in the synapsis of 3200bp separated DSEs.

In contrast, using the GFP-based reporters 53BP1 depletion induced a 2-fold decrease in the rejoining efficiency of close as well as distal ends measured, thus independently of the distance between the two I-SceI sites (Figure 3A, green plots). As we have previously reported that 53BP1 protects against extended deletion in A-EJ (Grabarz et al., 2013) the decrease of GFP^+ cells should thus result from increased degradation of DNA ends rapidly disrupting the expression of the reporter gene, which is located only 17bp from the I-SceI cleavage site. Therefore we examined the repair junctions on CD4-based substrate, which allows more mutagenic events since the reporter genes are located 211bp from the I-SceI site (see Figure 1A).

53BP1 protects against long deletions on distal but not on close ends. Sequencing the repair junctions show that silencing 53BP1 decreased the ratio 3'-Pnt usage (C-NHEJ)/deletion (A-EJ) both with distal (CD4-3200bp) and close (CD4-34bp) DSBs (Figure 3B). This shows that 53BP1 protects against A-EJ, consequently favoring C-NHEJ, independently of the distance between the two I-SceI sites.

Surprisingly, silencing 53BP1 increased the frequency of long deletions (>30pb) only with distal ends but not with close ends (Figure 3B, bottom panel).

Altogether these results indicate that 53BP1 protects against A-EJ independently of the distance between the two DSBs, but protects against long deletions associated with A-EJ on distal ends but not on close ends.

RIF1 protects against long deletions both on close and distal ends. Recently RIF1 was reported to protect DNA ends against long resection in combination with 53BP1 (Chapman et al., 2013, Di

Virgilio et al., 2013, Escribano-Díaz et al., 2013) and more specifically, we have demonstrated the combined role of 53BP1 and RIF1 in the protection against long deletions in A-EJ of distal ends (Grabarz et al., 2013). Therefore, we analyzed whether RIF1 acts on proximal *versus* distal ends, similarly to 53BP1. On distal ends (3200bp) while silencing RIF1 had no impact on the ratio C-NHEJ *vs*. A-EJ, in contrast with 53BP1, it protects against long resection, similarly to 53BP1 (Figure 4A). Incidentally, RIF1 depletion had no impact in the efficiency of the repair of distal ends joining measured with the GFP-3200bp reporter (supplemental data S3), which confirms that RIF1 does not regulate the ratio C-NHEJ *vs*. A-EJ in the repair of distal DNA ends.

In parallel, we measured the impact of RIF1 depletion on the rejoining of close ends. Similarly to the repair of distal ends, RIF1 depletion had no impact on the ratio C-NHEJ *vs.* A-EJ (Figure 4A and supplemental data S3). Consistently, depletion of RIF1 did not affect the efficiency of end joining measured with the GFP-based reporter (Supplementary S3). Analysis of the deletion sizes distribution reveals that RIF1 protects against long deletions also on close ends, in contrast with 53BP1 (Figure 4B).

Altogether these data indicate that while 53BP1 protects against long deletions on distal ends but not on close ends, RIF1 exerts this role on both distal and close ends. This data unravel a separation of functions between 53BP1 and RIF1, in the protection of DNA ends against resection.

CtIP initiates A-EJ on distal ends but not on close ends. We have recently reported that CtIP initiates long deletions, upon 53BP1 depletion (Grabarz et al., 2013). Silencing CtIP in 53BP1-depleted cells restored the ratio 3'Pnt usage/deletion (i.e. C-NHEJ/A-EJ) on distant end to the level of control cells (Figure 5A). However, depleting CtIP did not rescue the percentage of C-NHEJ on close ends. Moreover, CtIP silencing also rescued the frequency of long deletions induced by 53BP1 depletion on distant ends (Figure 5B). Consistently, with the GFP-based reporters (GFP-34bp or GFP-3200bp), CtIP depletion rescued the decrease in the percentage of GFP^+ cells with distal ends but not with close ends, in 53BP1-depleted cells (Figure 5B). This observation confirms that upon 53BP1 depletion, CtIP initiates long deletions on distal ends on close ends.

Taken together these data underline that fact that close and distal ends are differently processed for resection. Indeed, CtIP induces long deletion, which is counteracted by 53BP1 on distal

but not on proximal ends. On close ends long deletions are independent of the antagonist action 53BP1 *versus* CtIP.

53BP1 and RIF1 protects against CtIP-mediated complex insertional rearrangements at the repair junctions of distal ends. The joining of distal ends, favors A-EJ and DNA capture/insertion (see Figure 1). Thus, we addressed the question of the role of the balance CtIP versus 53BP1/RIF on such processes. Interestingly, depletion of 53BP1 or RIF1 stimulated the frequency of insertion at distant ends. Consistently, depletion of CtIP abolished the stimulation of insertions in 53BP1-depleted cells (Figure 6A). Interestingly, depletion of CtIP also decreased de frequency of insertions in 53BP1 proficient cells, on distant as well as on close DSEs (Figure 6A). These data show that CtIP largely participate to the formation of insertions, on close as well as on distant ends. However, this process is more efficient on distant ends, but is repressed by 53BP1. Noteworthy, most of the insertions are associated with deletions at the recipient site, consistently with an implication of A-EJ in such processes.

Remarkably, most of the insertion correspond to chromosomal sequences either adjacent to the I-SceI cleavage site (duplication of CD4 sequence) or capture of ectopic chromosome sequences (Figure 6B). Noteworthy, some of the capture/insertions events correspond to the assembly of sequences from different chromosomes. Moreover, most of the insertions were flanked by nucleotides from unidentified origin (Figure 6C). Finally, some insertions/capture events involved mosaic sequences from different chromosomes interspaced with unidentified nucleotides. (Figure 6C). All these events underline the high complexity of the insertional/capture events at the repair junction.

Taken together the data show that distance between the DSEs favors A-EJ and complex insertional rearrangements at the repair junction. Importantly, we identified some genetic control of such event. Indeed, they are mainly CtIP dependent, and 53BP1 protects against such genetic rearrangements.

DISCUSSION

The data presented here show that the distance between the two DNA ends affects not only the efficiency but also the accuracy of DSB repair. Structurally, with the 34bp substrates the two DSB can be assimilated to a single DSB in which the two DNA ends are already in a close vicinity allowing their direct tethering and ligation. In this case, no real active synapsis is required. With the 3200bp substrates, although this distance is small at the whole genome scale, the two ends should be brought together for end-joining to occur; thus an active synaptic step is a pre-requisite prior the ligation of the two DSEs. In addition to the fact that the rejoining of distal ends necessary generates sequence rearrangements, the pre-synaptic and/or the synaptic steps further alter the quality of the sealed junctions. Indeed distant ends create two opportunities for mutagenesis to occurs at the sealed junctions: 1- physically, the distance between the two DSEs should give space enough for DNA ends modification machinery to insert in between the two ends; 2- the time during which the synapsis act gives time for DNA modification machinery to operate. Thus this "spatio-temporal gap jeopardizes genome stability maintenance, generating complex rearrangements at the repair junction.

The mutagenic events at the sealed junction from distant DSEs correspond not only to deletions but also deletions associated with insertions. Most of the insertions corresponds to chromosomal sequences either duplication from sequences adjacent to the DSB (CD4 sequences), similarly to some translocations events EWS/FlI-1 leading to Ewing sarcoma (Zucman-Rossi et al., 1998), or capture of ectopic sequences from different chromosomes. Importantly, several insertion/capture events correspond to the assembly of chromosome sequences from different chromosomes, and mosaic-like events have been observed. Strikingly, most of the insertion/capture events are flanked by unidentified sequence, and the mosaic insertion correspond to several pieces of different chromosomes interspaced by unidentified short sequences. The unidentified sequences could possibly correspond to non-template N-addition. Indeed, The polymerase Pol Theta is able to promote non-template N-additions (Hogg et al., 2012) and has been proposed to act in A-EJ in *Drosophila melanogaster* and in *Caenorhabditis elegans* (Koole et al., 2014, Chan, Yu, & McVey, 2010). Altogether these characteristics underline the high complex mutational landscape at the sealed junctions. Importantly, although 3200bp is a short distance at the whole genome scale, it is sufficient to generate genetic instability, particularly complex rearrangements at the repair junction.

Importantly, the present work identified some actors of the genetic controls of such complex events. Indeed, these events are promoted by CtIP, consistently with the fact that they are mainly promoted by A-EJ. Since distance between the two ends favors A-EJ, insertion/capture events are consistently favored on distant ends. Interestingly, in yeast, increased mobility of DSBs has been associated with DNA end resection, thus favoring the search for homology during homologous recombination, which involved distant DNA sequences (Dion et al., 2012, Miné-Hattab & Rothstein, 2012). Besides, in human cells, inhibition MRE11 that initiates resection with CtIP in A-EJ (Grabarz et al., 2013) reduces DNA ends mobility and ability to pair before the formation of a translocation (Roukos et al., 2013). Therefore, factors implicated in resection are also implicated in DNA ends mobility, which is a prerequisite to the ligation of distal ends. These results are in accordance with the implication of CtIP in the initiation of A-EJ with distal ends but not with close ends.

In addition, 53BP1 and RIF1 protects against CtIP-mediated insertion/capture. Of note the present data show that 53BP1 did not differently affected the efficiency of end-joining as a function of the distance between the DNA ends, suggesting that, at least for such distance range, 53BP1 is not involved in the synapsis of distant DSEs, but only in the protection against A-EJ initiation, both on close ad distant ends. Surprisingly CtIP was involved in the generation of long deletion only on distant but not on close DSEs, showing that cells the DSB repair machineries are sufficiently sensitive to distinguish between these two type of DSEs topologies and that, although 3200 bp is not a long distance. Since CtIP has been proposed to be involved in single strand DNA (ssDNA) resection at DSEs (Sartori et al., 2007), the present data can be unified in the following model (Figure 7): On close DSBs, DSEs, are protected by 53BP1/RIF1, are immediately tethered then ligate. This gives neither space nor time for CtIP to efficiently generate ssDNA, even in absence of 53BP1. With the 3200bp distant DSBs, DSEs are protected by 53BP1/RIF1 but excision of the internal fragment give space and the synapsis requirement gives time for dissociation of 53BP1 from the DNA ends and for CtIP to intrude, and the synapsis might provide time for CtIP to act, especially in absence of 53BP1. In addition, ectopic DNA fragments from other chromosomes can also be resected by CtIP, generating ssDNA on which micro-homologies annealing can generate mosaic sequences and can facilitate insertion into the sealed junction (which are also resected). Moreover N-addition at the DNA

extremities might generate longer ssDNA tails, thus favoring the probability of annealing between the chromosomal excised fragments themselves and with the insertion locus.

High and complex rearrangements, named chromotripsis, have been observed at translocations points in tumor cells. Although the molecular mechanisms of chromotripsis remind to be identified, the complexity of the rearrangements is consistent with the actions of several processes including both C-NHEJ and A-EJ have, in addition to other processes (Stephens et al., 2011). It is thus tempting to speculate that the processes described her refers, at least in part, to such complex rearrangements. Note that in this case, the distance between the DSEs is generally much greater and the complexity of the rearrangements might increase with the distance between the interacting DSEs. In this context 53BP1/RIF1 might protect against CtIP-induced complex rearrangements at translocation points.

In conclusion, few kb distances between two DSEs, which is very short to the nucleus scale, are sufficient to jeopardize DSB repair both efficiency and accuracy. This distance between the two DSB favors CtIP-mediated A-EJ favoring the insertion/capture of ectopic rearranged sequences, from other chromosomes, thus leading to complex scars at the re-sealed junctions. In addition, cell response is sufficiently sensitive to differently process such distal ends. The present data unravel importance of the balance 53BP1/RIF1 *versus* CtIP, in protection against such complex events.

Figure Legends

Figure 1. The distance between DSB directly regulates the efficiency of end joining. A/ The four substrates used here to measure End Joining. CD4 based reporters. These constructs are composed of reporter genes coding for membrane antigens and two cutting sites for the meganuclease I-SceI located in non-coding sequences. Before cleavage by I-SceI cells are CD4 negative (CD4-) because i) in CD4-3,200bp: the CD4 coding gene is too far from the promoter, ii) in CD4-34bp: the internal fragments contains a Kozak sequence leading to a traduction out of frame of the CD4 gene. The CD4-3200bp. After I-SceI cleavage, the internal fragment of 3,200bp is excised and the direct ligation of the CD4 reporter gene downstream of the promoter leading to its expression. The ATG of the CD4 gene is located 211 bp from the 3' I-SceI site. The CD4-34bp. After I-SceI cleavage, the internal fragment containing the Kozak sequence is eliminated and the direct ligation of the CD4 reporter gene down to the promoter induces the expression of CD4. GFP-based substrates. The constructs are the same as the CD4-based reporters except that the distance between the 3' I-SceI site and the ATG of the reporter gene is 17bp instead of 211bp. **B/** Measurement of the End Joining efficiency with regards to the distance between the I-SceI sites. GC15, GC49 and GC92 are three independent clones bearing the CD4-3200bp substrate; GCS5, GCS16 and GCS17 are three independent clones bearing both CD4-3200bp and GFP-34bp; GCSH10, GCSH14, GCSH26 are three independent clones bearing both CD4-3200bp and GFP-3200bp; Finally GCK1, GCK9 and GCK20 are three independent clones bearing the CD4-34bp. Values represent the average ± SEM.

Figure 2. The repair on close ends is more conservative but deletions in A-EJ on close ends are bigger A/ Distal CD4-32OObp and close 34bp intrachromosomal substrates. I-SceI cleaves the two sites (black arrows) flanking H2Kd sequence, promoter and CD4 gene are joined by C-NHEJ or A-EJ mediated nucleotide deletions. **B/** % of C-NHEJ *versus* A-EJ events, distribution of the deletion sizes at the re-sealed junctions and % of insertions in the repair events on distal (CD4-3200bp) or close (CD4-34bp) ends.

Figure 3. 53BP1 favors C-NHEJ on both close or distal ends but does not protect against long deletions on close ends. A/ Frequency of End Joining measured as the percentage of GFP+ or CD4 + cells after silencing of 53BP1 in GC92, GCK20, GCSH14 and GCS17. The frequencies of end joining

(CD4+ or GFP+ cells) are normalized to the frequency of cells exposed to the control siRNA. Values represent the average ± SEM. **B/** Analysis of the fidelity of end joining on the CD4-3200bp (GC92 cells) or the CD4-34bp (GCK20 cells). Upper table: number of sequences analyzed in each condition, percentage of the use of C-NHEJ (use of 3'Pnt) vs. A-EJ (deletions) in each condition. Bottom panel: Distribution of the deletion sizes with the CD4-3,200bp or the CD4-34bp substrates.

Figure 4. Impact of RIF1 on the distal or close ends rejoining. **A/** Impact of RIF1 or 53BP1 silencing on the fidelity of end joining on the CD4-3200bp (GC92 cells) or the CD4-34bp (GCK20 cells). Number of sequences analyzed in each condition, percentage of the use of C-NHEJ (use of 3'Pnt) vs. A-EJ (deletions) in each condition. **B/** Distribution of the deletion sizes with the CD4-3200bp or the CD4-34bp substrates.

Figure 5. Impact of CtIP on the distal or close ends rejoining. **A/** Impact of CtIP and/or 53BP1 silencing on the fidelity of end joining on the CD4-3200bp (GC92 cells) or the CD4-34bp (GCK20 cells). Number of sequences analyzed in each condition, percentage of the use of C-NHEJ (use of 3'Pnt) vs. A-EJ (deletions) in each condition. **B/** Impact of CtIP and/or 53BP1 silencing on the efficiency of end joining measured with the GFP based reporter, GFP-3,200bp and GFP-34bp. Values represent average ± SEM. **C/** Distribution of the deletion sizes with the CD4-3,200bp or the CD4-34bp substrates.

Figure 6. Complex insertion/capture rearrangements at repair junctions. A/ Impact of CtIP and/or 53BP1 silencing on the insertion rate at distal end-joining (CD4-3200bp, GC92 cells). **B/** Origins of insertions of each insertional sequence. Each sequence was identified using Basic Alignment Search Tool (BLAST) program. % of chromosomal capture insertion, insertions associated with deletions and insertions coupled to addition of non-templated nucleotides **C/** Mosaic sequence example.

Figure 7. Different protection and resection systems for the End Joining on close or distal ends. A/ On close ends, 53BP1 and RIF1 protect DSEs against resection. Close proximity of DSE allows quick tethering and ligation. **B/** With distal ends, an active synaptic step is a pre-requisite prior the ligation of the two DSEs altering the quality of the sealed junctions : CtIP mediated deletions and generating complex rearrangements at the repair junction.

Supplemental Figure Legends

Figure S1. Junction sequences distal vs. proximal with no siRNA (not shown)

Figure S2. Junction sequences distal and proximal upon 53BP1, and/or RIF1 and/or CtIP depletion (not shown)

Figure S3. Efficiency of end-joining as mesured by GFP based reporters in RIF1 and/or 53BP1 depleted cells. Impact of RIF1 and/or 53BP1 silencing on the efficiency of end joining measured with the GFP based reporter, GFP-3200bp and GFP-34bp. Values represent average ± SEM.

Beck, C., Boehler, C., Barbat, J. G., Bonnet, M.-E., Illuzzi, G., Ronde, P., … Dantzer, F. (2014). PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic Acids Research*, 1–17. doi:10.1093/nar/gku174

Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., & Stark, J. M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genetics*, *4*. doi:10.1371/journal.pgen.1000110

Bétermier, M., Bertrand, P., & Lopez, B. S. (2014). Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? *PLoS Genetics*, *10*(1), e1004086. doi:10.1371/journal.pgen.1004086

Boboila, C., Jankovic, M., Yan, C. T., Wang, J. H., Wesemann, D. R., Zhang, T., … Alt, F. W. (2013). Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(14), 3034–3039. doi:10.1073/pnas.1302919110

Bothmer, A., Robbiani, D. F., Di Virgilio, M., Bunting, S. F., Klein, I. a, Feldhahn, N., … Nussenzweig, M. C. (2011). Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Molecular Cell*, *42*(3), 319–29. doi:10.1016/j.molcel.2011.03.019

Bothmer, A., Robbiani, D. F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A., & Nussenzweig, M. C. (2010). 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(4), 855–65. doi:10.1084/jem.20100244

Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J. M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., … Jonkers, J. (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*, 688–695. doi:10.1038/nsmb.1831

Budman, J., Kim, S. A., & Chu, G. (2007). Processing of DNA for nonhomologous end-joining is controlled by kinase activity and XRCC4/ligase IV. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*, 11950–11959. doi:10.1074/jbc.M610058200

Bunting, S. F., Call??n, E., Wong, N., Chen, H. T., Polato, F., Gunn, A., … Nussenzweig, A. (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, *141*, 243–254. doi:10.1016/j.cell.2010.03.012

Cary, R. B., Peterson, S. R., Wang, J., Bear, D. G., Bradbury, E. M., & Chen, D. J. (1997). DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(9), 4267–4272. doi:10.1073/pnas.94.9.4267

Chan, S. H., Yu, A. M., & McVey, M. (2010). Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in Drosophila. *PLoS Genetics*, *6*(7), e1001005. doi:10.1371/journal.pgen.1001005

Chapman, J. R., Barral, P., Vannier, J. B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., … Boulton, S. J. (2013). RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Molecular Cell*, *49*, 858–871. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.002

Deriano, L., Stracker, T. H., Baker, A., Petrini, J. H. J., & Roth, D. B. (2009). Roles for NBS1 in alternative nonhomologous end-joining of V(D)J recombination intermediates. *Molecular Cell*, *34*(1), 13–25. doi:10.1016/j.molcel.2009.03.009

Di Virgilio, M., Callen, E., Yamane, A., Zhang, W., Jankovic, M., Gitlin, A. D., … Nussenzweig, M. C. (2013). Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science (New York, N.Y.)*, *339*, 711–5. doi:10.1126/science.1230624

Difilippantonio, S., Gapud, E., Wong, N., Huang, C.-Y., Mahowald, G., Chen, H. T., … Nussenzweig, A. (2008). 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. *Nature*, *456*(7221), 529–33. doi:10.1038/nature07476

Dimitrova, N., Chen, Y.-C. M., Spector, D. L., & de Lange, T. (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature*, *456*(7221), 524–8. doi:10.1038/nature07433

Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B. D., & Gasser, S. M. (2012). Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nature Cell Biology*, *14*(5), 502–509. doi:10.1038/ncb2465

Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J. T. F., Tkáč, J., … Durocher, D. (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Molecular Cell*, *49*(5), 872–83. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.001

Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-barbat, J., & Lopez, B. S. (2012). Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice be- tween homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *American Journal of Cancer Research*, *2*(3), 249–268. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365807/\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365807/pdf/ajcr0002-0249.pdf

Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J. J., Barascu, A. A., Pennarun, G. G., Genet, D., Rass, E., … Lopez, B. S. (2013). A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell Reports*, *5*(1), 21–8. doi:10.1016/j.celrep.2013.08.034

Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., & Lopez, B. S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Molecular Cell*, *14*, 611–623. doi:10.1016/j.molcel.2004.05.008

Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., & Lopez, B. S. (2007). Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(52), 20902–7. doi:10.1073/pnas.0708541104

Hogg, M., Sauer-Eriksson, A. E., & Johansson, E. (2012). Promiscuous DNA synthesis by human DNA polymerase θ. *Nucleic Acids Research*, *40*(6), 2611–22. doi:10.1093/nar/gkr1102

Koole, W., van Schendel, R., Karambelas, A. E., van Heteren, J. T., Okihara, K. L., & Tijsterman, M. (2014). A Polymerase Theta-dependent repair pathway suppresses extensive genomic instability at endogenous G4 DNA sites. *Nature Communications*, *5*, 3216. doi:10.1038/ncomms4216

Krawczyk, P. M., Borovski, T., Stap, J., Cijsouw, T., ten Cate, R., Medema, J. P., … Aten, J. a. (2012). Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Science*, *125*(Pt 9), 2127–33. doi:10.1242/jcs.089847

Maher, C. A., & Wilson, R. K. (2012). Chromothripsis and human disease: Piecing together the shattering process. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2012.01.006

McVey, M., Radut, D., & Sekelsky, J. J. (2004). End-joining repair of double-strand breaks in Drosophila melanogaster is largely DNA ligase IV independent. *Genetics*, *168*, 2067–2076. doi:10.1534/genetics.104.033902

Miné-Hattab, J., & Rothstein, R. (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nature Cell Biology*, *14*(5), 510–517. doi:10.1038/ncb2472

Piganeau, M., Ghezraoui, H., De Cian, A., Guittat, L., Tomishima, M., Perrouault, L., … Brunet, E. (2013). Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *Genome Research*, *23*(7), 1182–93. doi:10.1101/gr.147314.112

Ramiro, A. R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H.-T., McBride, K. M., … Nussenzweig, M. C. (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. *Nature*, *440*(7080), 105–9. doi:10.1038/nature04495

Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., & Lopez, B. S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(8), 819–24. doi:10.1038/nsmb.1641

Reina-San-Martin, B., Chen, J., Nussenzweig, A. A., & Nussenzweig, M. C. (2007). Enhanced intra-switch region recombination during immunoglobulin class switch recombination in 53BP1-/- B cells. *European Journal of Immunology*, *37*(1), 235–9. doi:10.1002/eji.200636789

Roukos, V., Voss, T. C., Schmidt, C. K., Lee, S., Wangsa, D., & Misteli, T. (2013). Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6146), 660–4. doi:10.1126/science.1237150

Sartori, A. a, Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., … Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, *450*(7169), 509–14. doi:10.1038/nature06337

Shao, Z., Davis, A. J., Fattah, K. R., So, S., Sun, J., Lee, K.-J. J., … Chen, D. J. (2012). Persistently bound Ku at DNA ends attenuates DNA end resection and homologous recombination. *DNA Repair*, *11*(3), 310–6. doi:10.1016/j.dnarep.2011.12.007

Simsek, D., & Jasin, M. (2010). Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(4), 410–6. doi:10.1038/nsmb.1773

Soutoglou, E., Dorn, J. F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., … Misteli, T. (2007). Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, *9*(6), 675–82. doi:10.1038/ncb1591

Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G. R., Mudie, L. J., … Campbell, P. J. (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, *144*, 27–40. doi:10.1016/j.cell.2010.11.055

Ward, I. M., Reina-San-Martin, B., Olaru, A., Minn, K., Tamada, K., Lau, J. S., … Chen, J. (2004). 53BP1 is required for class switch recombination. *The Journal of Cell Biology*, *165*(4), 459–64. doi:10.1083/jcb.200403021

Weterings, E., & Van Gent, D. C. (2004). The mechanism of non-homologous end-joining: A synopsis of synapsis. *DNA Repair*. doi:10.1016/j.dnarep.2004.06.003

Xie, A., Kwok, A., & Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(8), 814–8. doi:10.1038/nsmb.1640

Yan, C. T., Boboila, C., Souza, E. K., Franco, S., Hickernell, T. R., Murphy, M., … Alt, F. W. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*, *449*(7161), 478–82. doi:10.1038/nature06020

Zucman-Rossi, J., Legoix, P., Victor, J. M., Lopez, B., & Thomas, G. (1998). Chromosome translocation based on illegitimate recombination in human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(20), 11786–91. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21718&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

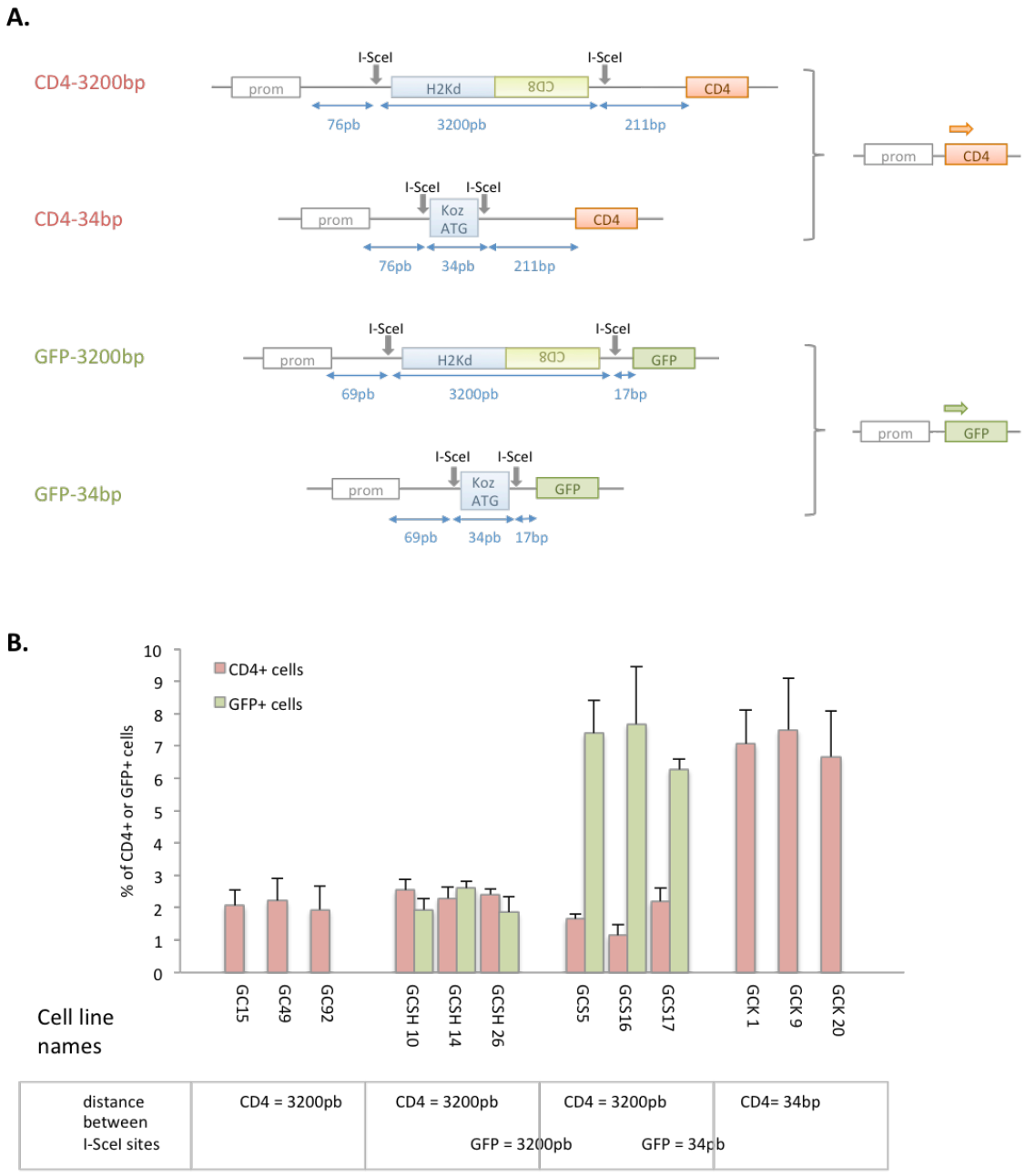
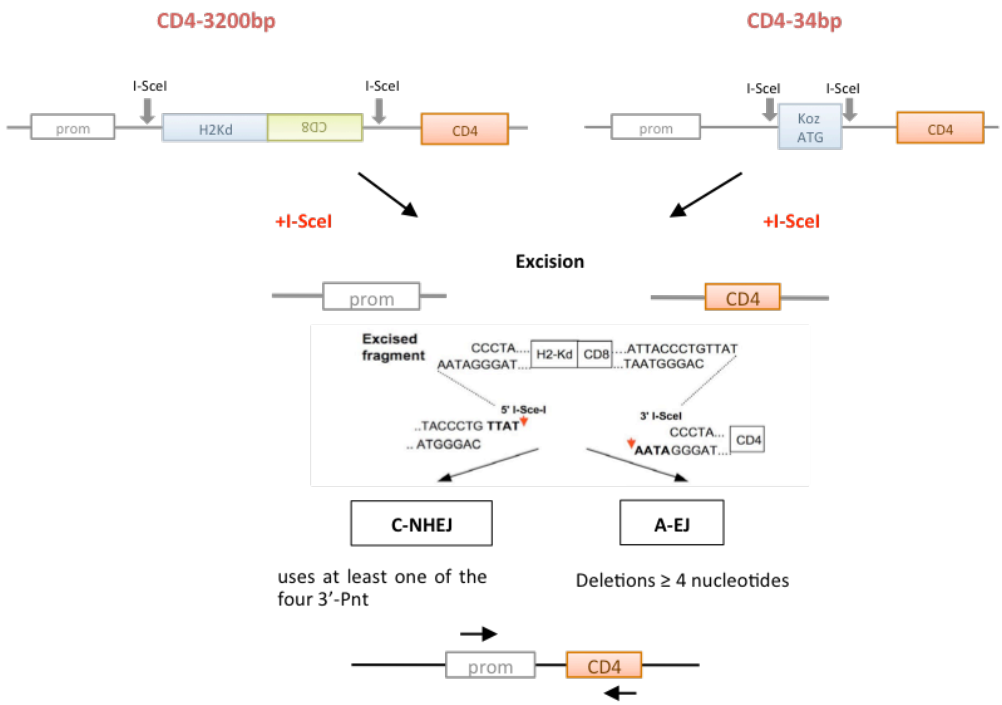


Figure 1 : Guirouilh-Barbat J, et al..

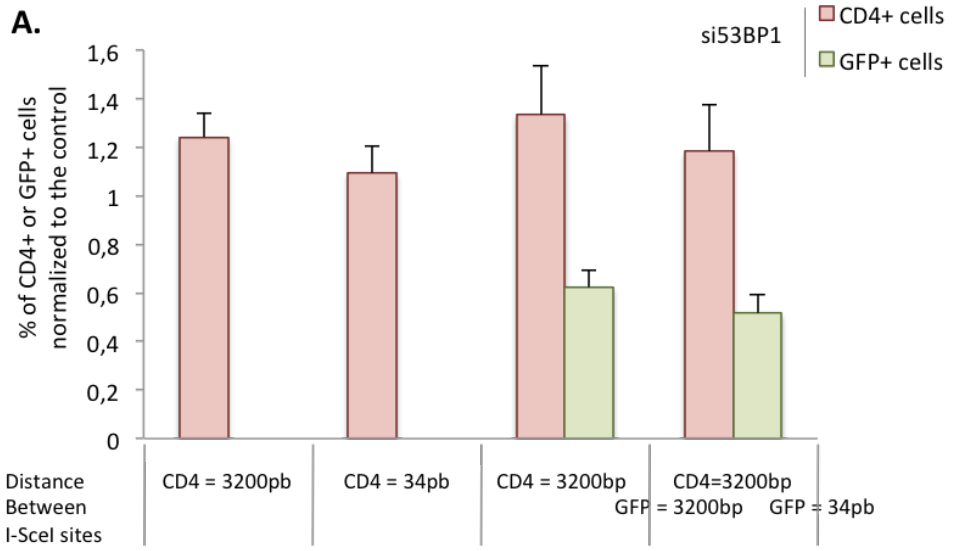
A.



B.

		CD4-3200bp Distant DSEs	CD4-34bp Close DSEs
use of 3'-Pnt (C-NHEJ)		**45%**	**62%**
Del of 3'Pnt (A-EJ)		**55%**	**38%**
Deletions	4 to 30 nts	75%	50%
	30 to 100 ts	12.5%	14.3%
	>100 nts	**12.5%**	**35.7%**
Insertions		**29.4%**	**16.7%**

Figure 2 : Guirouilh-Barbat J, et al.



B.

	CD4-3200bp		CD4-34bp	
	siCTRL	si53BP1	siCTRL	si53BP1
# of sequences	202	117	55	56
Use of 3'-Pnt	45,0%	31,6%	61,8%	50,0%
Del of 3'Pnt (A-EJ)	55,0%	68,4%	38,2%	50,0%

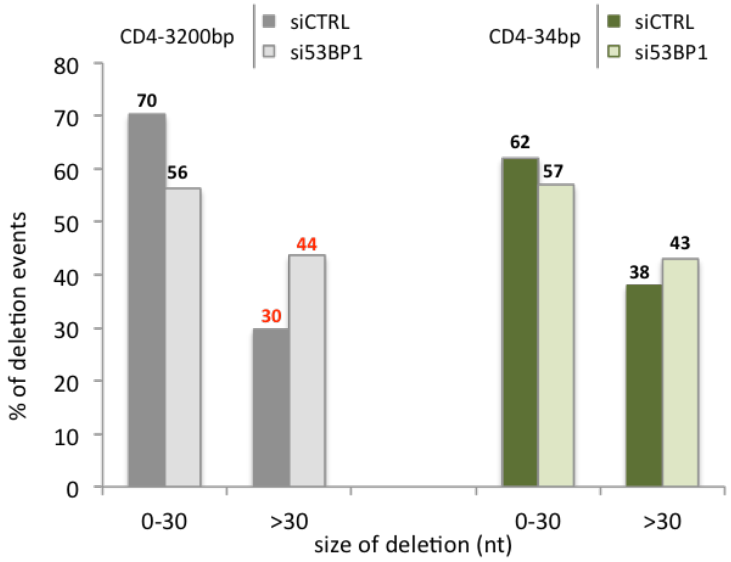


Figure 3 : Guirouilh-Barbat J, et al.

A.

	CD4-3200bp			CD4-34bp		
	siCTRL	si53BP1	siRif1	siCTRL	si53BP1	siRif1
# of sequences	112	75	88	55	56	30
Use of 3'Pnt	45.5%	**36.0%**	51.1%	61.8%	**50.0%**	60.0%
Del of 3'Pnt (A-EJ)	54.5%	64.0%	48.9%	38.2%	50.0%	40.0%

B.

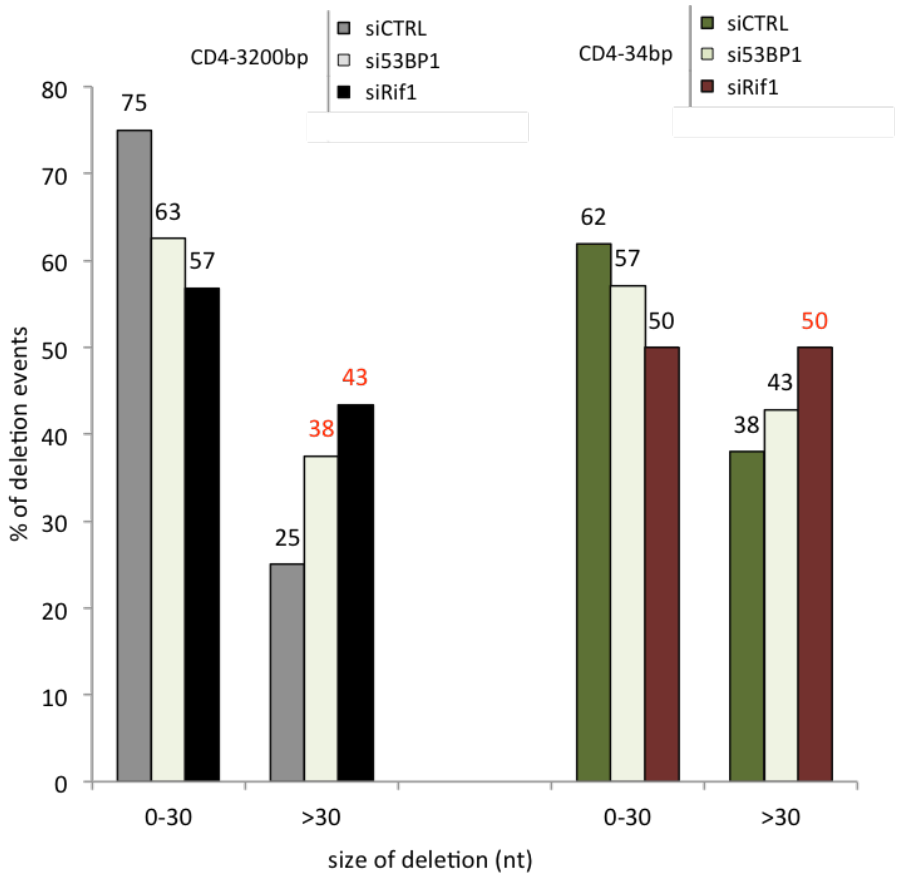
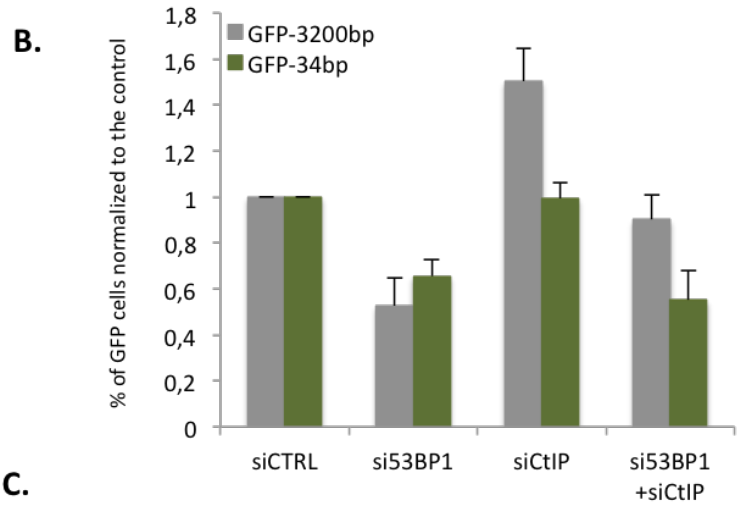


Figure 4 : Guirouilh-Barbat J, et al.

A.

	CD4-3200bp				CD4-34bp			
	siCTRL	si53BP1	siCtIP	si53BP1+ siCtIP	siCTRL	si53BP1	siCtIP	si53BP1+ siCtIP
# of sequences	112	75	75	50	55	56	39	37
Use of 3'Pnt	45.5%	36.0%	49.3%	44.0%	61.8%	50.0%	79.5%	54.0%
Del of 3'Pnt (A-EJ)	54.5%	64.0%	50.7%	56.0%	38.2%	50.0%	20.5%	46.0%



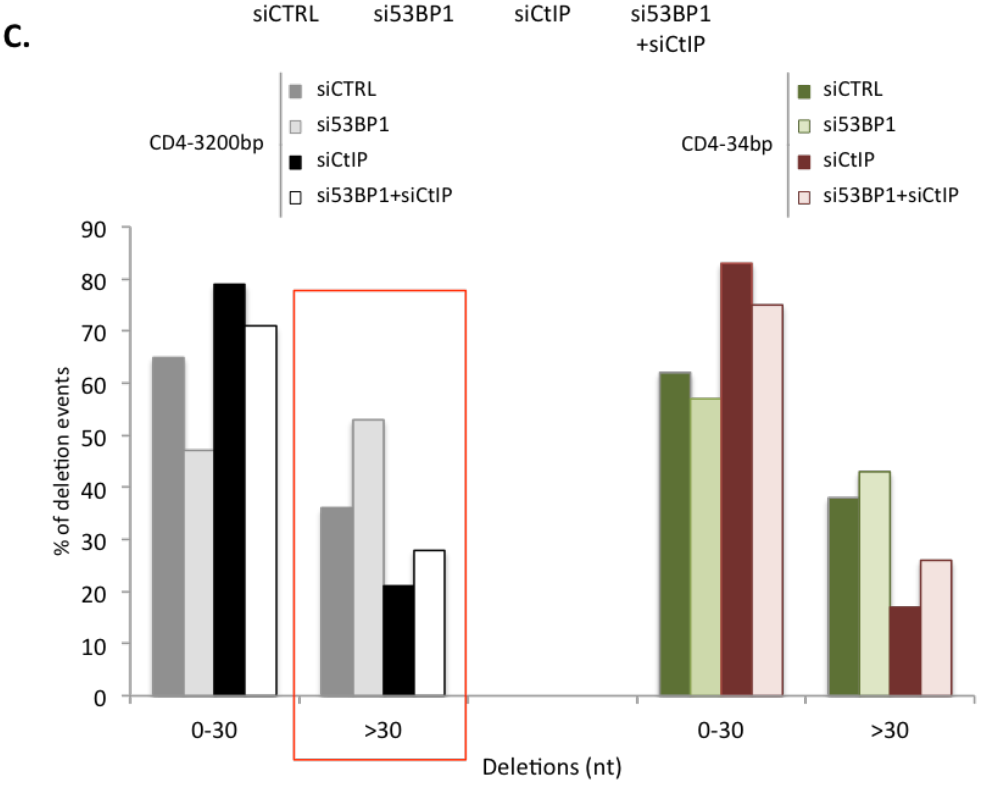
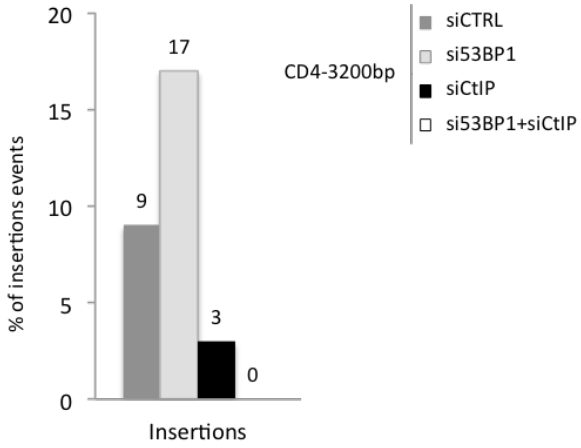


Figure 5 : Guirouilh-Barbat J, et al.

A.



B.

		Origins of insertions							% of insertions coupled to addition of non-templated nucleotides
		Intrachromosomal EJ substrate duplication	Chromosomal capture	Plasmid vector	Other	Mosaic sequences	% Chromosomal insertions	% Insertions with deletions	
siRNA	NT	4/10	4/10	1/10		1/10	40%	80%	75%
	53BP1	1/13	7/13	1/13	1/13	3/13	70%	92%	80%
	Rif1	3/27	15/27	3/27	2/27	4/26	65%	82%	76%
	53BP1/ Rif1		10/11			1/11	**100%**	**100%**	**90%**
	CtIP	2/2					0%	0%	
	53BP1/ CtIP						-	-	

C.

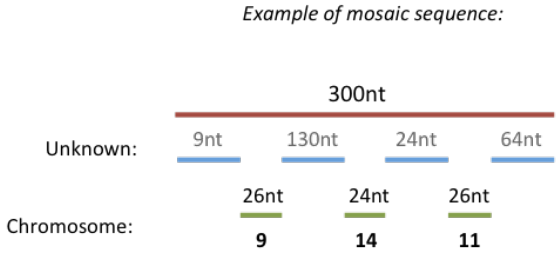


Figure 6 : Guirouilh-Barbat J, et al.

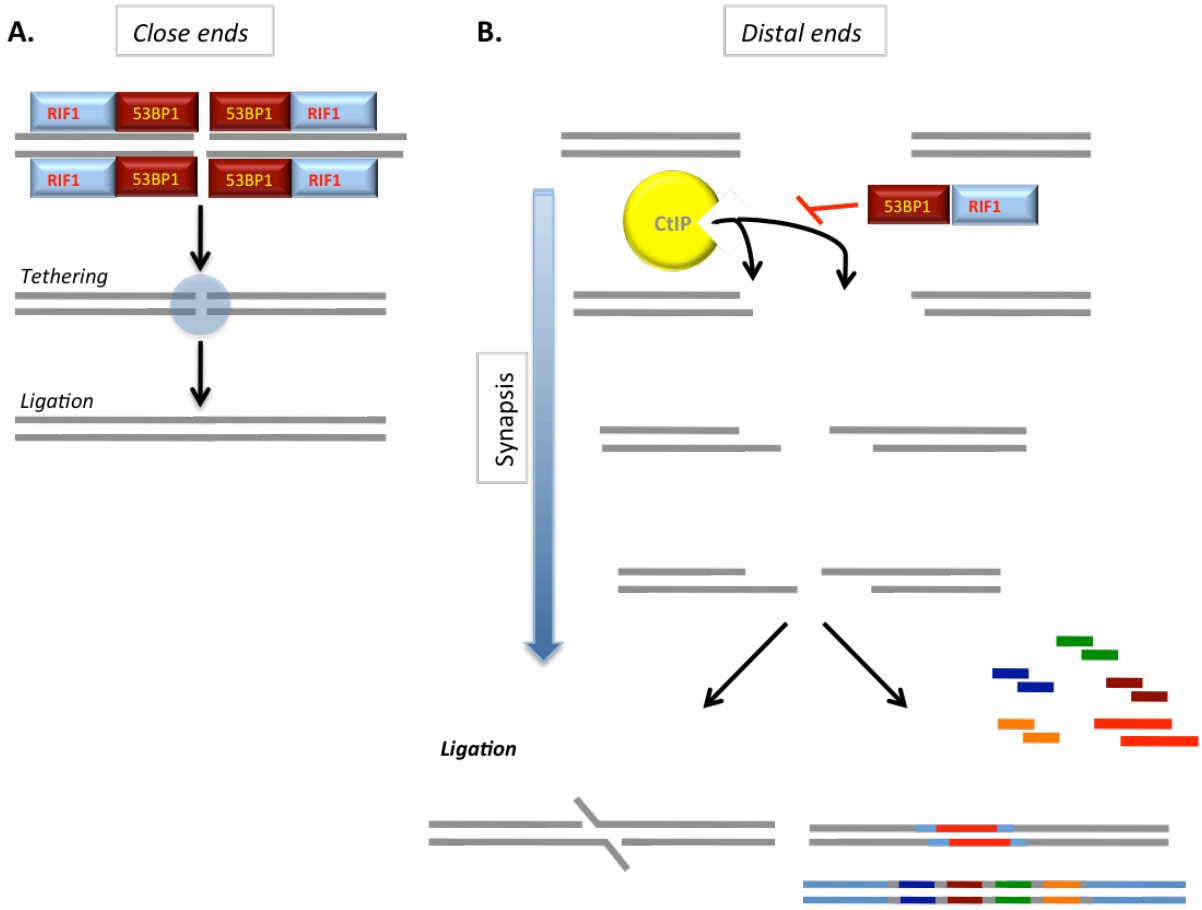


Figure 7 : Guirouilh-Barbat J, et al.

S3.

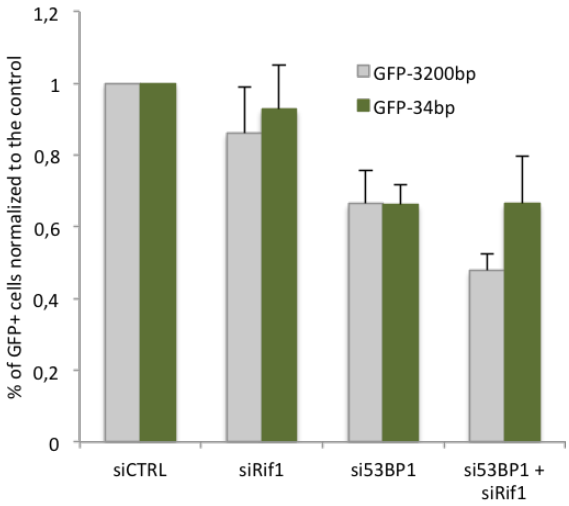


Figure S3 : Guirouilh-Barbat J, et al.

Résumé de l'article 2

Dans cet article, nous avons étudié l'impact de la distance séparant deux CDB sur l'éfficacité et sur la fidélité du EJ de leurs extrémités. En effet, l'EJ d'extrémités distales (3200 pb) ne peut avoir lieu qu'après formation d'une synapse permettant le rapprochement des extrémités. A l'inverse deux extrémités proches (34 pb) sont directement reliées et liguées. Ainsi, nous avons utilisé des substrats intrachromosomiques permettant de mesurer l'efficacité du EJ par cytométrie en flux (expression CD4 et GFP) et sa fidélité par PCR et séquençage des jonctions de réparation.

Nous démontrons que le EJ d'extrémités proximales (34 pb) est plus efficace et plus fidèle que le EJ d'extrémités distales (3200 pb) (figures 1 et 2). Dans un premier temps, nous avons entrepris d'étudier les acteurs de la protection et de l'initiation de la résection au niveau des extrémités proximales et distales. Par l'utilisation de siARN, nous avons démontré que 1/53BP1 protégeait les extrémités contre l'initiation de la résection 2/RIF1 protégeait contre l'extension de la résection au niveau des extrémités proximales et distales et que 3/CtIP initiait la résection au niveau des extrémités distales (figures 3 et 4).

Nous avons également démontré que le EJ d'extrémités distales engendrait plus de réarrangements aux jonctions de réparation. Ces insertions sont associées à la présence de délétions, ainsi elles sont contrecarrées par la présence de 53BP1, RIF1 et l'inhibition de CtIP (figures 5 et 6).

Pour conclure, la distance séparant les extrémités de CDB a un impact direct sur l'efficacité et la fidélité de EJ ; une distance de quelques kb favorise l'action du A-EJ médiée par CtIP et des réarrangements complexes aux jonctions de réparation.

.

Discussion

L'efficacité du EJ est dépendante de la distance séparant deux CDB

A. La religature d'extrémités distales propice aux réarrangements complexes est majoritairement éffectuée par l'A-EJ

1. Efficacité du C-NHEJ et de l'A-EJ

Dans l'article 2, nous avons étudié l'efficacité et la fidélité de la réparation de deux CDB par le EJ en fonction de la distance les séparant. Les résultats sont présentés sous la forme de schémas récapitulatifs : figure 6 de l'article 2 et figure 14.

Premièrement, la réparation de CDB proches (séparées par 34 pb) est plus efficace que celle de CDB éloignées (3200 pb). Cette limitation du EJ aux CDB proches implique un concept de « mesure » du risque par la cellule. En effet, la religature d'extrémitées proches entraîne peu ou pas de perte d'information : le EJ est donc toléré, voir stimulé. Au contraire, la religature de deux CDB éloignées conduit nécessairement à une modification de l'information génique pouvant aboutir à un événement facilitant la tumorigénèse, le EJ doit donc être évité. L'A-EJ est davantage représenté dans la réparation d'extrémités distales appuyant le caractère délétère de cette réparation. A l'inverse, au niveau des extrémités proches, le C-NHEJ est favorisé au détriment de l'A-EJ. On peut postuler que le recrutement rapide de DNA-PK, dès l'apparition des extrémités de CDB proches, favoriserait le maintien à proximité des extrémités et ainsi l'action du C-NHEJ.

La réparation par EJ de CDB éloignées diffère de celle des extrémités proches car elle nécessite la formation d'une synapse et le rapprochement des extrémités. Dès lors, les protéines impliquées dans le rapprochement dynamique des extrémités et leur appariement sont d'éventuels acteurs du EJ distal. Seul 53BP1 est décrit comme ayant un effet distance dépendant sur la réparation des CDB au locus *IgH*. Ce rôle passe par la formation d'une synapse de réparation permettant le rapprochement des cassures (Reina-San-Martin et al., 2007). L'inhibition de 53BP1 n'ayant aucun effet sur le taux de NHEJ distal ou proximal avec nos substrats, un autre mécanisme doit renter en jeu. L'équipe de Misteli a mis en évidence l'implication de MRE11 dans l'appariement d 'extrémités éloignées prélude à la formation de translocations (Roukos, Voss, et al., 2013). S'il est déjà connu que l'inhibition de MRE11 diminue l'efficacité de EJ d'extrémités distales (Rass et al., 2009), il serait intéressant de comparer l'impact de l'inhibition de MRE11 sur l'efficacité du EJ proximal. De plus, le complexe XRCC4/Cernunnos crée un filament pouvant potentiellement relier les deux extrémités d'une cassure (Ropars et al., 2011, Ochi et al., 2014). De même il a été proposé que les extrémités d'une CDB étaient reliées par le complexe MRN via l'activité ATPase de RAD50 (Deshpande et al., 2014). Nous allons donc prochainement étudier la potentielle implication de ces acteurs dans (1) l'efficacité du NHEJ proximal versus distal et (2) dans la protection des extrémités contre la résection.

Nous aimerions également déterminer s'il existe une régulation distance-dépendante du EJ en fonction du stress réplicatif. Nous pouvons en effet postuler qu'en présence d'un stress réplicatif propice au blocage de fourches et à la création de CDB, le EJ distal est inhibé afin d'éviter les réarrangements délétères. Nous avons mesuré l'efficacité du EJ distal et proximal après ajout de faibles doses d'hydroxyurée (HU) ou d'aphidicoline (APH) de manière chronique (sur 4 jours). L'HU et l'APH ralentissent la vitesse des fourches de réplication par déplétion du pool de nucléotides et inhibition de l'activité de la polyméraseα respictivement, créant ainsi un stress réplicatif. Nous disposons de quelques résultats préliminaires présentés Figure 15. Nous observons une régulation du EJ dépendante de la distance séparant deux CDB ; le EJ d'extrémités éloignées (3200bp-GFP et 3200bp-CD4) est fortement inhibé suite à un faible stress réplicatif (10 uM d'HU et 35 ng/ml d'APH) alors que l'EJ d'extrémités proches est inhibé de manière moins importante. Ceci indiquerait qu'en présence d'un stress réplicatif il existerait une voie de signalisation permettant l'inhibition spécifique du EJ distal et donc la protection contre les réarrangements chromosomiques. Cette inhibition du EJ doit être vérifiée et comparée à l'éventuelle activation des checkpoints médiés par ATR et ATM. Notons que la distance de 3200bp séparant les deux CDB est une distance très courte à l'échelle du noyau. Cette distance est cependant suffisante pour être reconnue et prise en charge différentiellement par la cellule (par rapport à une distance de 34 pb). Des expériences en cours visent à étudier l'impact de l'inhibition d'ATR et de CHK1 sur l'efficacité différentielle du EJ proximal vs distal.

2. Initiation de la résection, grandes délétions et réarrangements

Il faut distinguer l'étape d'initiation de la résection représentée par le taux de jonctions présentant des délétions supérieures à 4 pb i.e le taux d'A-EJ, et l'étape d'extension de la résection mise en évidence par l'apparition de grandes délétions aux jonctions de la réparation effectuée par A-EJ. Avec notre substrat 3200bp-CD4 (également appelé pCOH-CD4), plusieurs acteurs ont été mis en évidence dans la protection des extrémités, comme 53BP1, BLM et RIF1, et dans l'initiation et/ou l'extension de la résection tels CtIP, BLM et MRN (Grabarz et al., 2013b, Rass et al., 2009). Notre étude des acteurs de la protection ou de la résection dans l'article 1, visait également à déterminer si deux extrémités proches séparées par 34 pb étaient prises en charge par la machinerie de protection et de résection de la même manière. Nous avons tout d'abord remarqué que si l'utilisation de la voie canonique du EJ est majoritaire au niveau de la religature d'extrémités proches, les délétions y sont plus longues suggérant une prise en charge différentielle par les exonucléases.

L'étude des jonctions dans la religature d'extrémités distales après inhibition de 53BP1 et/ou RIF1 semble refléter deux rôles distincts de ces protéines dans la protection des extrémités. L'inhibition de 53BP1 altère la balance C-NHEJ/A-EJ et conduit à l'apparition de grandes délétions. Une inactivation de CtIP supprime cette initiation accrue de la résection, dans les cellules déplétées en 53BP1. 53BP1 inhibe donc l'initiation de la résection par CtIP et l'extension de la résection. L'inhibition de RIF1 n'altère pas la balance C-NHEJ/A-EJ mais la résection initiée est systématiquement importante (>30 pb). Cela reflèterait une stimulation de l'activité catalytique de CtIP ou de nucléases restant à caractériser dans l'A-EJ, en absence de RIF1. Nous pensons qu'au niveau de la religature d'extrémités distales, 53BP1 est impliqué dans la protection des extrémités contre l'initiation de la résection par CtIP et en complexe avec RIF1 dans l'inhibition de son extension.

Au niveau de la réparation des extrémités proximales, une inhibition de 53BP1 engendre une augmentation de l'A-EJ, ce qui suggère que la protection des extrémités contre la resection est également asssurée par 53BP1. Cependant, la double extinction 53BP1/ CtIP ne change pas le taux d'A-EJ observé en l'absence seule de 53BP1. Une autre nucléase serait donc à l'origine de l'initiation de la résection au niveau des extrémités proches. De plus, de manière surprenante, seul RIF1 semble être impliqué dans la protection contre les grandes délétions. Nous mettons pour la première fois, en évidence, une implication de RIF1 dans la résection, indépendante de la présence de 53BP1. Afin de mieux caractériser l'inhibition de l'activité nucléase par RIF1, nous pourrions inhiber par siARN la protéine 53BP1 endogène et un mutant non phosphorylable de 53BP1, incapable de recruter RIF1, pourra être transfecté afin de déterminer si l'intéraction 53BP1/RIF1 est nécessaire à la formation de grandes délétions lors de l'A-EJ (mutant « ATM site-deficient 53BP128A » de (Bothmer et al., 2011). La ou les nucléases impliquée(s) dans l'initiation et dans l'extension de la résection au niveau des extrémités de CDB proches et reste(nt) également à caractériser. Nous allons prochainement tester l'éventuelle implication d'EXO1.

De plus, l'étude des jonctions démontre que le EJ d'extrémités de CDB éloignées favorisent l'apparition d'insertions i.e de réarrangements aux jonctions par rapport au EJ de CDB proches. Ces insertions se produisent durant le rapprochement dynamique des extrémités éloignées conduisant à la formation d'une synapse. En effet, durant le laps de temps séparant la formation de la cassure et la ligature des extrémités la mobilité des extrémités pourrait favoriser la « captation » d'un fragment d'ADN. Les extrémités de CDB proches n'ayant pas besoin d'être rapprochées pour être liguées, le taux d'insertion est beaucoup plus faible. Nous avons également observé que le taux d'insertions était augmenté en absence de 53BP1 ou de RIF1 suggérant un lien direct entre la protection des extrémités et les insertions. Les insertions concernent à la fois des séquences chromosomiques, répétées ou non, des séquences plasmidiques et des réarrangements chromosomiques complexes : avec des séquences chromosomiques non identifiées. Ces séquences non identifiées pourraient correspondre à l'addition de nucléotides « non-templated » par la polymérse θ (theta). En effet plusieurs équipes ont décrit une action de cette polymérase aux jonctions de réparation par EJ chez *D. melagonaster* et *C. elegans* (S. H. Chan, Yu, & McVey, 2010, Roerink et al., 2014, Koole et al., 2014). Nous disposons de siARN dirigés contre le messager de cette polymérase nous permettant de tester cette hypothèse très prochainement.

Les événements de chromotripsis font suite à la fragmentation d'une ou plusieurs région(s) chromosomique(s) et au nouvel agencement aléatoire des fragements chromosomiques. Dans beaucoup de cas de chromothripsis décrits, les points de cassure et de jonction présentent des zones de micro-homologie de quelques nucléotides, ou encore de petites insertions et délétions, en faveur d'un réassemblage des fragments chromosomiques pulvérisés par le EJ (Stephens et al., 2011). De plus de nombreux cas rapportés se caractérisent par la présence, au niveau des points de cassure, d'inversions, de duplications ainsi que d'insertions de petites séquences qui sont homologues à d'autres segments du même ou d'un autre chromosome rappelant le type d'événements observés lors de la religature d'extrémités distales (Liu et al., 2012)(articles 1 et 2). Dès lors, nous pouvons supposer que les réarrangements complexes observés lors du phénomène de chromotripsis soient dépendants de l'action de CtIP.

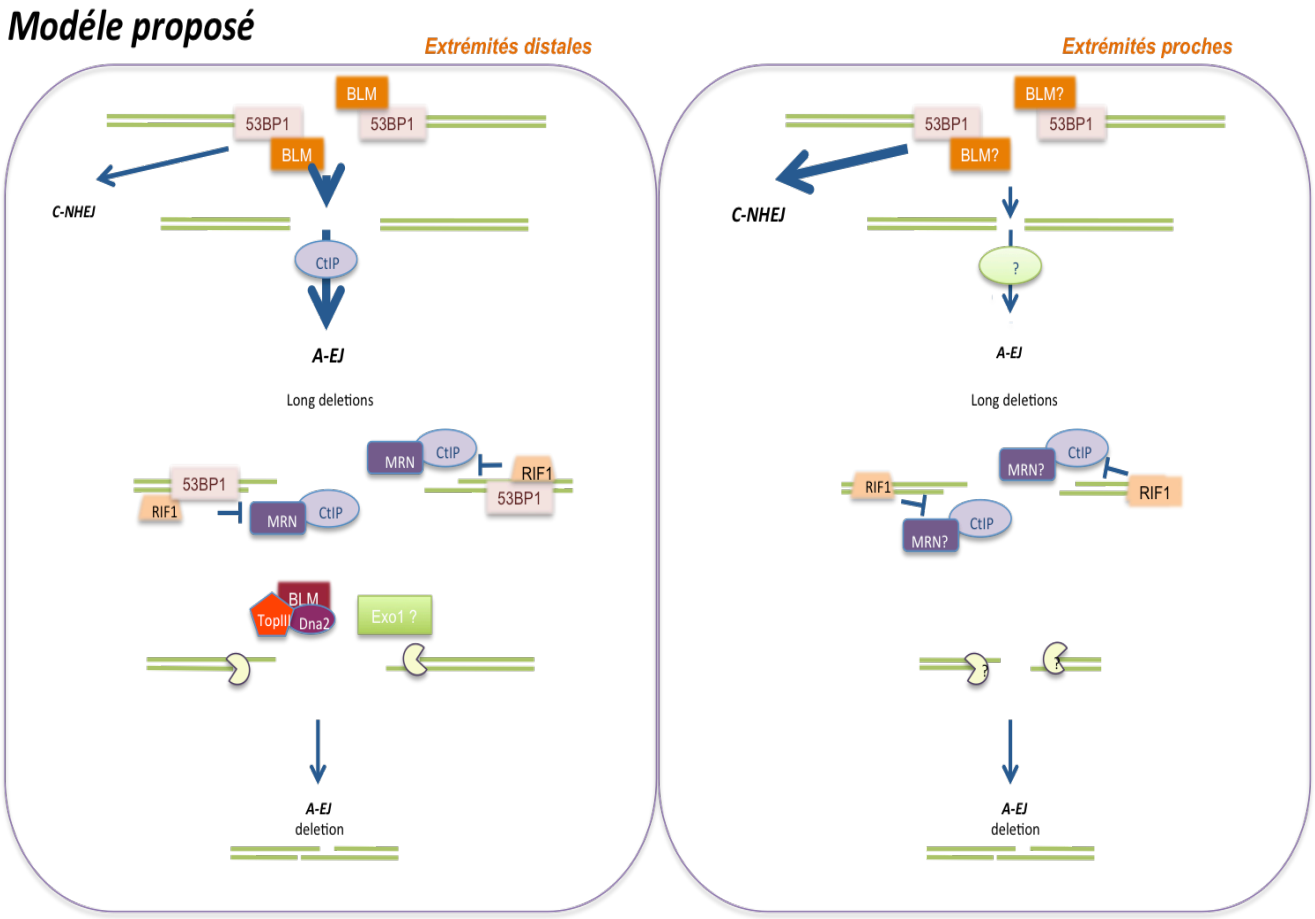
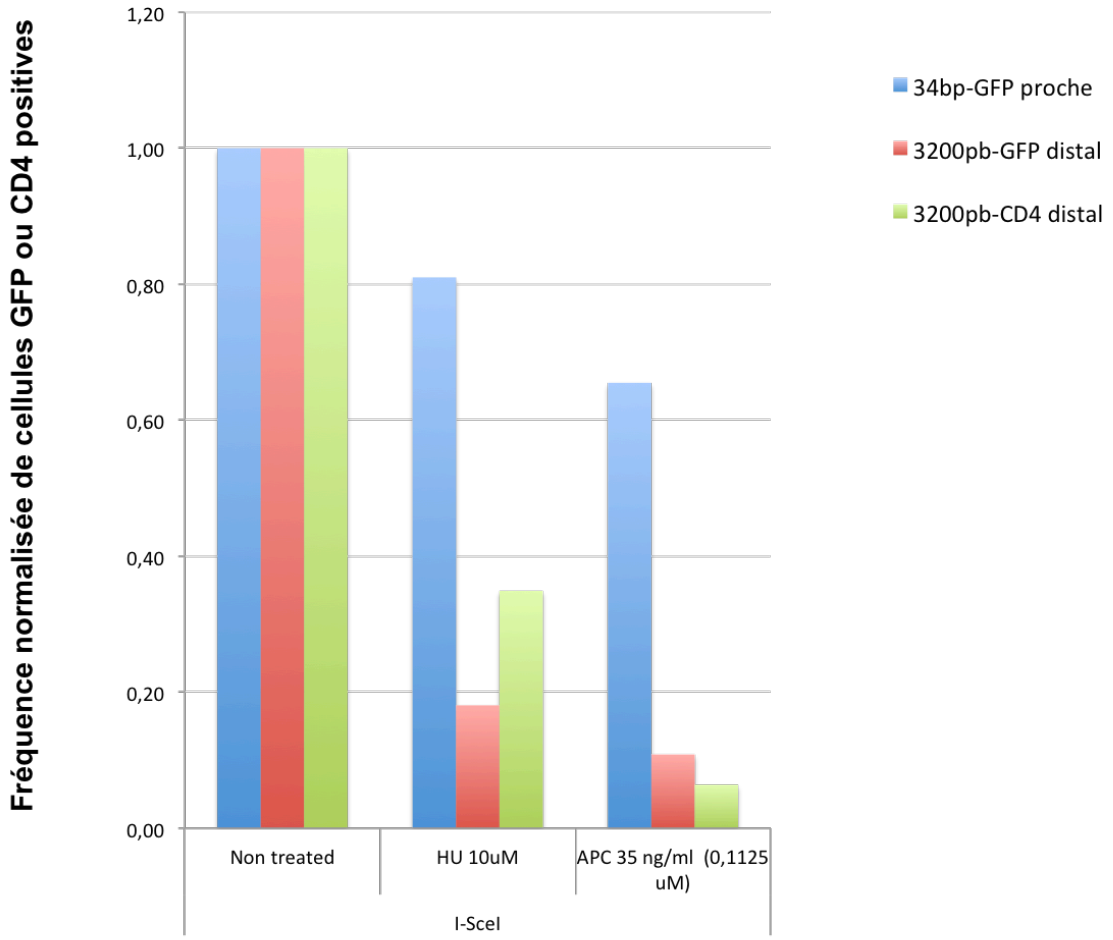


Figure 14: Modèle de réparation par EJ en fonction de la distance séparant deux CDB.

Les extrémités distales séparées par 3200 pb, sont protégées contre l'initiation de la résection par CtIP *via* la fixation de BLM et 53BP1 (Grabarz et al., 2013). L'extension de la résection i.e l'apparition de grandes délétions est contrecarrée par l'action conjointe de 53BP1 et RIF1. En absence de ceux-ci, la résection est effectuée par MRN/CtIP et le complexe BLM/Dna2/TopIII. L'implication d'EXO1 n'est pour l'instant, que supposée.

La protection des extrémités proches contre l'initiation de la résection est également inhibée par 53BP1, l'implication de BLM restant à démontrer. CtIP n'est pas impliquée dans l'inititation de la résection, les nucléases responsables de l'inititation de la résection au niveau des extrémités proches n'ont pas été caractérisées. L'extension de la résection est en partie due à l'action de MRN/CtIP et d'autres nucléases restant à caractériser.



<u>Figure 15 :</u> Résultats préliminaires : L'EJ distal est inhibé en présence d'un faible stress réplicatif chronique.

Les lignées cellulaires GCS5 et GCSH14 présentées dans l'article 1 ont été utilisées. La lignée GCS5 possède le substrat 34 pb-GFP proche et le substrat 3200 pb-GFP distal. La lignée GCSH14 posséde les deux substrats distaux 3200 pb-GFP et 3200 pb-CD4. 6h après ensemencement, de l'hydroxyurée ou de l'aphidicoline a été ajouté au sein du milieu de culture. Le lendemain, les cellules ont été transfectées par le vecteur permettant l'expression d'I-SceI. L'analyse par cytométrie en flux a permis la mesure quantitative de l'expression de CD4 et de la GFP.

B. Complexe de cohésion et NHEJ

1. Le complexe de cohésion inhibe le EJ d'extrémités distales

Nous avons démontré que le complexe de cohésion était impliqué dans l'inhibition de la religature d'extrémités distales et que ce rôle était essentiel au maintien de la stabilité génétique. Plusieurs points restent cependant à éclaircir.

Concernant le mécanisme d'action des cohésines dans l'inhibition du NHEJ distal, nous avons deux hypothèses (Figure 4 article 1).

La première est que la proximité physique de la chromatide sœur inhibe le NHEJ distal. L'inhibition du NHEJ distal post-réplicatif serait liée au rôle en *trans* du complexe : la cohésion des chromatides sœurs essentielle à la RH et à la ségrégation mitotique.

La deuxième hypothèse est liée au rôle du complexe dans la formation de boucles chromatiniennes en *cis*. De part son implication dans la régulation de la transcription et de la réplication, la formation de boucles de chromatine par les cohésines est effectuée tout au long du cycle cellulaire. Suite à la formation de CDB, les boucles formées par le complexe de cohésion permettraient la séparation des cassures. Même si la taille moyenne des boucles formées par les cohésines n'a pas été déterminée et que leur visualisation par microscopie électronique est impossible, les données de la littérature indiquent qu'elles peuvent être de taille extrêment variable et modulable. Par exemple, les boucles correspondant aux réplicons sont visualisables par la formation d'un « halo » nucléaire dont la taille est dépendente de la vitesse de réplication (Guillou et al., 2010, Courbet et al., 2008).

Nous avons essayé, sans succès de synchroniser les cellules déplétées pour RAD21 en G1. Nous avons testé différents composés (thymidine et mimosine) et différents temps de blocage sans succès. Le blocage à la mimosine entraîne par exemple une tétraploidie accrue, vraisemblablement car la cellule ne peut se diviser correctement avec les dommages accumulés en phase S. Une alternative visant à séparer ces deux potentiels mécanismes passerait par l'inhibition de l'acétyl-transférase spécifique du complexe de cohésion : ESCO2 ou de la sororin qui permettent respectivement l'établissement et le maintien de la cohésion post réplicative. L'inhibition de ces protéines réduirait alors la proximité de la chromatide sœur sans affecter la formation de boucles de chromatine. Nous allons effectuer ces expériences prochainement. Des fibroblastes dérivés de patients atteints de syndrome de Roberts (mutation ESCO2) sont également disponibles si nous voulions pousser l'étude et intégrer les substrats au sein des lignées où la cohésion des chromatides sœurs est altérée (van der Lelij et al., 2009).

Il serait également intéressant de déterminer si l'inhibition du NHEJ d'extrémités distales est liée à l'action de complexes de cohésion déjà mis en place ou recrutés lors de la génération de CDB.

L'utilisation d'allèles thermosensibles chez *S. cerevisae* a permis de démontrer que l'établissement de la cohésion en phase S n'était pas suffisante à la réparation post réplicative

(Sjögren & Nasmyth, 2001). Chez les mammifères, le complexe régule un grand nombre de mécanismes qu'il est difficile de découpler. Il est possible que les cohésines déjà présentes en G1 au niveau de promoteurs ou des complexes d'initiation de la réplication influent la conformation chromatinienne suite à une CDB. Cependant, aucune protéine permettant uniquement le chargement des cohésines suite à un dommage n'a été décrite : NIPBL permet le chargement des cohésines à la fois aux promoteurs des gènes dont elles régulent l'expression, mais également au niveau des complexes pre-RCs et aux CDB (Oka et al., 2011, Kagey et al., 2010). Nous avons démontré que NIPBL était requis pour l'inhibition du NHEJ distal mais nous ne savons pas quelle fonction du complexe est essentielle.

Peut-être faudrait-il inhiber CTCF qui est associé au complexe à de nombreux sites de transcription. Si cette inhibition augmente le NHEJ d'extrémités distales, alors celle-ci serait liée aux cohésines déjà chargées. Cependant si au contraire, l'inhibition de CTCF n'a pas d'impact, nous ne pourrions exclure que les cohésines chargées indépendamment de CTCF au niveau de sites de transcription influent sur le NHEJ distal. Il faut préciser que la réparation des CDB générées par I-SceI dans nos systèmes est mesurée à un locus transcrit.

De plus, un autre complexe permet le recrutement des cohésines aux CDB : le complexe SMC5/SMC6 (Potts et al., 2006). Celui-ci *via* son activité de SUMO ligase médié par la protéine MMS21 du complexe SMC5/SMC6 permet la sumoylation de RAD21 (RAD21 est nommé Scc1 dans cet article (N. Wu et al., 2012)). Cette sumoylation est indispensable à la recombinaison homologue mais pas au recrutement du complexe aux CDB ni à la cohésion des chromatides sœurs. L'utilisation d'un mutant non sumoylable de RAD21 (mutant 15KRR (N. Wu et al., 2012)) permettrait donc de découpler les rôles du complexe de cohésion au cours du cycle cellulaire (réplication, transcription et mitose) de son rôle spécifique dans la réparation de l'ADN, du moins de son rôle dans la RH. Cette sumoylation pourrait être importante dans la signalisation permettant l'inhibition du NHEJ distal.

Pour finir, il faudrait déterminer si l'action des cohésines résulte de l'activation d'une voie de signalisation. Comme ATM et ATR phosphorylent SMC1 sur deux sites, il serait intéressant de tester si une mutation dans ces sites de phosphorylation influe le NHEJ d'extrémités distales.

Nous avons mis en évidence que l'inhibition de RAD21 condusait à l'apparition de fusions interchromosomiques et de structures radiales. Ces deux évènements résultent de l'augmentation du EJ distal. Nous voulions mettre directement en évidence l'implication du EJ dans la formation de ces stuctures en inhibant l'expression du gène de la LIG4 en absence de RAD21. Mais, après 72h d'expression des siARN *LIG4* et *RAD21*, le taux de mortalité cellulaire était extrèmement élevé et très peu de métaphases ont pu être analysées. Les expériences effectuées avec l'inhibiteur de DNA-PKcs (NU7026) ont également conduit à une mortalité cellulaire élevée. Cela semble suggérer que malgré l'instabilité génétique générée (fusions et réarrangements), le C-NEHJ serait essentiel à la survie des cellules déplétées en cohésines. Les cohésines affectant la recombinaison homologue entre chromatides sœurs (Potts et al., 2006), nous aimerions déterminer si l'augmentation du EJ est liée à ce défaut de RH. Pour cela, nous pourrions procéder à une extinction par siARN de

RAD51 au sein des cellules déplétées en RAD21 et observer si le EJ distal est stimulé de manière synergique.

Le séquençage de l'exome a révélé un taux élevé de réarrangements intra et inter chromosomes (figure 3 et figure S2 article1). Le séquençage a été effectué 72h après transfection des cellules par un siARN RAD21. Les réarrangements observés sont donc la conséquence d'un ou deux cycle(s) cellulaire(s) effectué(s) en absence de RAD21. Les translocations sont liées au EJ d'extrémités de deux CDB distales i.e sur deux chromosomes différents (Bunting et Nussenzweig 2013). Les grandes délétions (>500 pb) sont liées à une activité de EJ distale intrachromosomique. Les grandes insertions sont également liées au EJ distal, cependant, nous n'avons pas, pour le moment obtenu les séquences nous permettant de définir l'origine des fragments insérés. Nous n'avons pas non plus les séquences correspondant aux jonctions entre les séquences réarrangées. Il serait intéressant de voir si les réarrangements observés sont associés à de grandes délétions i.e de l'A-EJ.

L'inhibition de RAD21 favorise le EJ distal et l'apparition de translocations. Dès lors, nous aimerions déterminer quelle est l'étape stimulée ou altérée dans la formation de translocation. La formation d'une synapse de réparation permettant le rapprochement des extrémités pourrait par exemple être inhibé par le complexe de cohésion. Nous pourrions utiliser le système développé par le laboratoire de Misteli afin d'évaluer le rôle de RAD21 dans l'appariement des extrémités (Roukos, Voss, et al., 2013).

2. Altération du recrutement de 53BP1 en absence du complexe de cohésion

L'analyse des jonctions de réparation en absence de RAD21 a révélé la présence de grandes délétions (Article 1). Deux équipes ayant déjà démonté que l'absence des cohésines altérait le recrutement de 53BP1 aux CDBs (Watrin & Peters, 2009, Enervald et al., 2013), nous avons étudié l'effet de la co-déplétion RAD21/53BP1 sur la fidélité de réparation. Nous avons tout d'abord confirmé le défaut de recrutement de 53BP1 aux CDB au sein de nos cellules, par fractionnement cellulaire et immunofluorescence après irradiation (figure 12) puis séquencé les jonctions d'extrémités distales (figure 13). L'effet de la double inhibition RAD21/53BP1 reflète l'inhibition simple de 53BP1 démontrant une relation épistatique entre RAD21 et 53BP1. Les délétions observées en absence de RAD21 résultent bien d'une altération du recrutement de 53BP1 et donc de l'exposition des extrémités aux nucléases. Cependant, de manière surprenante la balance C-NHEJ/A-EJ n'est pas affectée en absence de RAD21. Ce qui suggère qu'en absence de RAD21, malgré le défaut de recrutement de 53BP1 à la chromatine, seule l'étape d'élongation de la résection serait stimulée, rappelant plus le phénotype observé en absence de RIF1 (dans l'article 2).

Au niveau des jonctions proximales (figure 16), la déplétion de RAD21 altère la balance C-NHEJ/A-EJ de manière similaire à 53BP1 mais non synergique, suggérant que l'initiation de la résection i.e la hausse d'A-EJ observée en absence de RAD21 est la conséquence directe d'un défaut de recrutement de 53BP1, effet opposé à celui observé au niveau des extrémités distales. Cependant, l'effet de la double délétion 53BP1/RAD21 sur la taille des délétions est synergique. Ceci pourrait refléter l'inhibition conjointe du recrutement de 53BP1 et RIF1 aux extrémités et la stimulation de la résection. Le recrutement de RIF1 doit être testé par western blot et analyse des jonctions distales et proximales résultant de la double inhibition RAD21/RIF1. L'analyse de la réparation des jonctions de réparation de

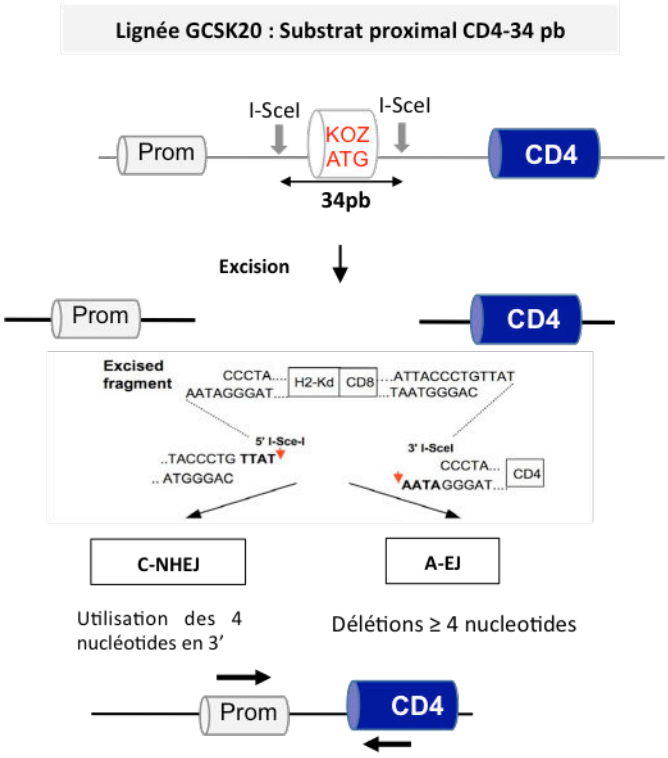
CDB proches ou distales en absence de 53BP1 et/ou de RIF1 et/ou de RAD21 révèle le caractère complexe de la machinerie de protection engagée.

Une autre hypothèse serait qu'au niveau proximal, RAD21 permettrait le recrutement d'un autre facteur protégeant les extrémités contre la résection. Le recrutement et l'activation de DNA-PK en absence de RAD21 doivent être évalués.

Une dernière hypothèse serait reliée au rôle de RAD21 dans la RH. En effet, les grandes délétions observées en absence de la RAD21 résulteraient d'une RH avortée : Suite à la création de CDB, la résection est engagée mais la chromatide sœur étant physiquement trop lointaine, la recherche d'homologie échoue et les brins réséqués sont religués. Un projet engagé au laboratoire cherche à caractériser cette interface RH /A-EJ.

Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses quant à l'altération du recrutement de 53BP1 en absence de RAD21. La plus plausible serait que la modification de l'architecture chromatinienne en absence des cohésines affecte les modifications d'histones nécessaires au recrutement de 53BP1 (H2AK15ub et H4K20me2). Il serait intéressant d'étudier le lien entre les modifications chromatiniennes et celle de l'architecture nucléaire engendrées par l'absence de cohésines et le recrutement de protéines de la réparation.

A.



B.

		siNT	siRAD21	si53BP1	siRAD21 + si53BP1
Use of 3'Pnt (C-NHEJ)		**69%**	**55%**	**47%**	**54%**
Del of 3'Pnt (A-EJ)		**31%**	**45%**	**53%**	**46%**
Deletions	4 to 30 nts	67%	33%	58%	47%
	> 30 nts	33%	39%	42%	53%
Nb of sequences		67	69	81	46

Figure 16: Analyse des jonctions de réparation d'extrémités proximales (34 pb) après déplétion combinée de 53BP1 et RAD21

(a) Substrat de EJ proximal.
(b) Analyse des jonctions de réparation, taux de C-NHEJ et A-EJ, taille des délétions nucléotidiques et nombre de séquences. La moyenne d'au moins deux expériences est représentée.

RAD21 et réplication

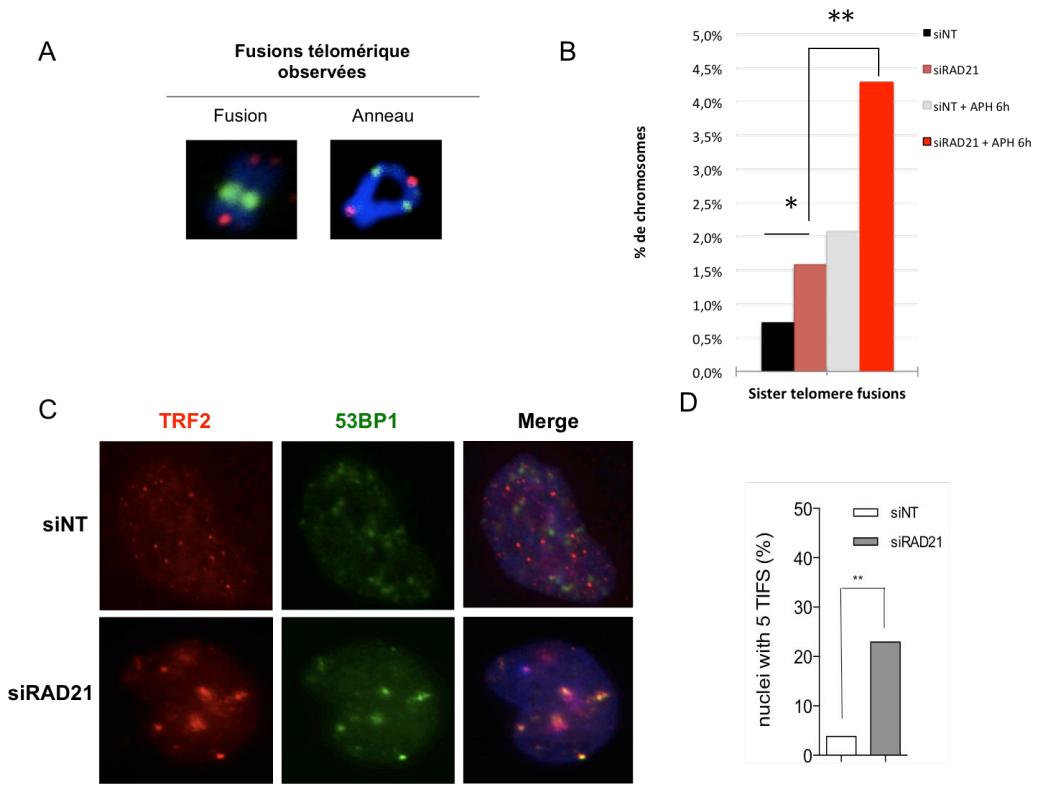
Nous avons mis en évidence l'apparition de structures radiales en absence de RAD21. Les structures radiales résultent de la fusion illégitime de CDB entre chromosomes. En absence de RAD21, il y a en effet un taux plus élevé de cassures chromatidiennes et chromosomiques (article 1). Aucune fusion interchromosomique ne découle d'une fusion entre séquences télomériques : En effet, aucun signal télomérique (sonde PNA) n'est observé au niveau des points de fusions. On peut postuler que les cassures observées sont la résultante d'un stress réplicatif endogène des cellules déplétées en RAD21. Les sites fragiles sont des séquences répliquées de manière incomplète devenant des points chauds de cassures et de réarrangements chromosomiques en mitose. Il est admis que les sites fragiles communs (CFS) sont situés sur les grands gènes (>800 kb) répliqués de manière tardive et transcrits. En effet, la collision des machineries de transcription avec les fourches de réplication crée des hybrides ARN:ADN qui sont des point chauds de cassures (Helmrich, Ballarino, & Tora, 2011). De plus, leurs séquences riches en CGG et AT favoriseraient les structures secondaires non B (comme des strucutures en épingles à cheveux) et entravent la progression des fourches de réplication (Durkin & Glover, 2007). Leur fragilité est accentuée est présence d'un stress réplicatif tel que l'ajout d'aphidicoline (APH) qui ralentit la progression des polymérases réplicatives. Les données bibliographiques et nos résultats d'exome confortent l'hypothèse que les CDB formées en absence de RAD21 fassent en partie suite à la réplication des sites fragiles. En effet, (1) des aberrations chromosomiques ont été reportées au niveau de sites fragiles en absence de SMC1 ou de SMC3 (Musio et al., 2005), (2) nous observons des fusions inter-chromosomes après ajout d'APH (article 1, figure 4) (3) l'analyse de l'exome effectué en absence de RAD21 montre une grande délétion au niveau du gène MITF situé en aval du site fragile FRA3B (figure S2 article1) et (4) l'analyse préliminaires des insertions et des délétions montre l'altération de plusieurs gènes situés au sein de sites fragiles (figure S4 article 1). L'implication des cohésines dans la réplication des sites fragiles n'a pas été caractérisée. Il a cependant été supposé que le complexe favoriserait le rédémarrage par RH des fourches bloquées au niveau de ces sites fragiles, une déplétion de SMC1 entrainant des aberrations (CDB) au niveau de plusieurs sites fragiles (Musio et al., 2005).

Le syndrome de Warsaw fait suite à une mutation dans l'hélicase CHLR1 (ou DDX11). Les caractéristiques biochimiques de cette protéine ont récemment été décrites (Y. Wu et al., 2012). Elle permet le passage de strutures complexes de l'ADN telles que les G-quadruplexes. Son interaction avec plusieurs protéines de la réplication telle PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) et avec le complexe de cohésion suggère un rôle clé dans l'interface réplication/réparation (Farina et al., 2008, Bharti et al., 2014). Il serait intéressant d'étudier le rôle de CHLR1 au niveau des sites fragiles, d'évaluer si son interaction avec le complexe de cohésion permet la réplication ou favorise le redémarrage des fourches au niveau de ces strutures complexes de l'ADN.

RAD21 et réplication télomérique

Nous avons également remarqué que l'absence de RAD21 il y a avait plus de fusions télomériques entre chromatides sœurs (figure 17 A et B). Les fusions télomériques résultents soit (1) d'une déprotection des télomères i.e d'une dissociation de TRF2 des télomères et de leurs fusions par EJ (Smogorzewska et al., 2002, Okamoto et al., 2013) soit (2) d'un défaut de réplication des séquences télomériques comme observé en absence de la protéine Apollo (Touzot et al., 2010).

En absence de RAD21 il y a formation de TIFs (Telomere dysfunction induced foci) mais la présence de TRF2 atteste de la protection des séquences télomériques (Deng et al., 2012 et figure 19 C). De plus les fusions augmentent en présene d'APH. Les fusions télomériques entre chromatides sœurs sont donc probablement la résultante d'un défaut de réplication des télomères. Le rôle de la protéine murine SA1 (sous-unité du complexe de cohésion) dans la réplication des télomères est décrit (Remeseiro et al., 2012). SA1 et les cohésines permettent la cohésion télomérique essentielle au redémarrage des fourches bloquées durant leur réplication. Une inactivation de SA1 entraine un défaut de réplication des télomères aboutissant à l'apparition de chromosome ségrégué tardivement (*lagging chromosome*) et de ponts anaphasiques ayant des conséquences graves pour le devenir cellulaire : l'apoptose ou la tétraploidie (figure 18). Les auteurs ont également signalé une augmentation des fusions entre chromatides sœurs sans réellement les expliquer. De manière tout à fait hypothétique, nous pouvons envisager là encore un role de l'intéraction du complexe de cohésion avec l'hélicase CHRL1 dans la réplication des structures spécialisées que sont les téloméres.



<u>Figure 17 :</u> L'absence de RAD21 conduit à la formation de fusions télomériques entre chromatides sœurs et à la formation de TIFs (Telomere dysfunction induced foci).

(c) Exemples de fusions télomériques recontrées. Après étalement des métaphases et marquage des télomères (rouge) et centromères (vert) par sondes PNA. Un seul signal télomérique central est représentatif de la fusion des télomères des chromatides sœurs. La figure en anneau correspond à la fusion des deux extrémités chromatidiques.

(d) Quantification des fusions de chromatides sœurs observées avec un siARN contrôle (noir) en absence de RAD21 (rose), siARN et ajout d'aphidicoline (0,3 uM) (gris) pendant 6h (gris) et en absence de RAD21 et ajout d'aphidicoline (rouge). siNT vs siRAD21, p=0,02, siRAD21 vs siRAD+APH p= 0,003, test de Student

(e) TIFs observés 72h après transfection des cellules avec un siARN contrôle : siNT ou après transfection d'un siARN RAD21.

(f) Quantification des TIFs observés en (b). Plus de 10 TIFs par cellule : siNT versus siRAD21, p=0,008, test de student.

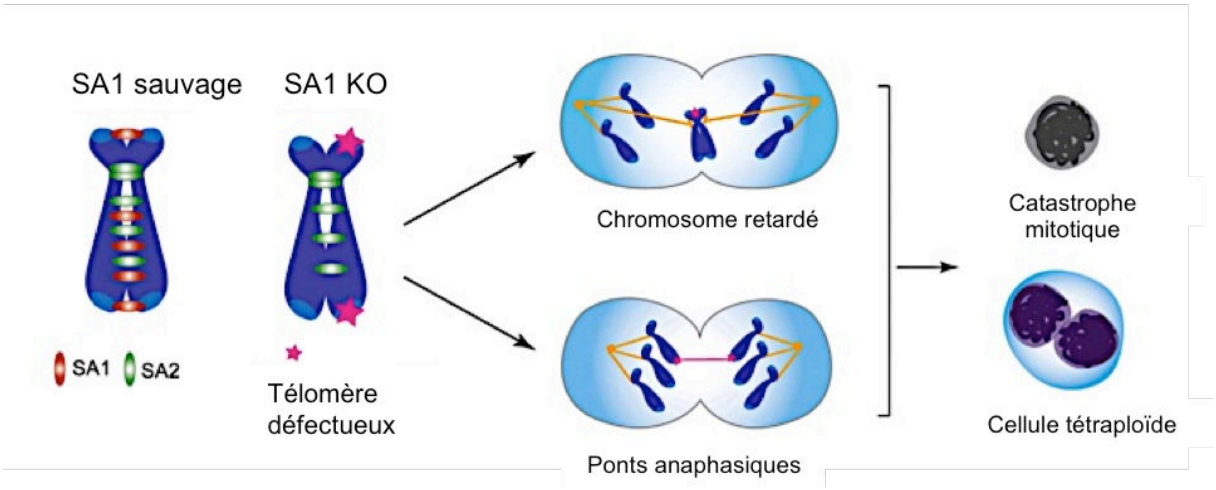


Figure 18 : Le rôle de SA1 dans la cohésion et la réplication télomérique est essentiel pour la bonne ségrégation chromosomique et dans la prévention de l'aneuploïdie.

Figure adaptée de (Remeseiro et al., 2012).

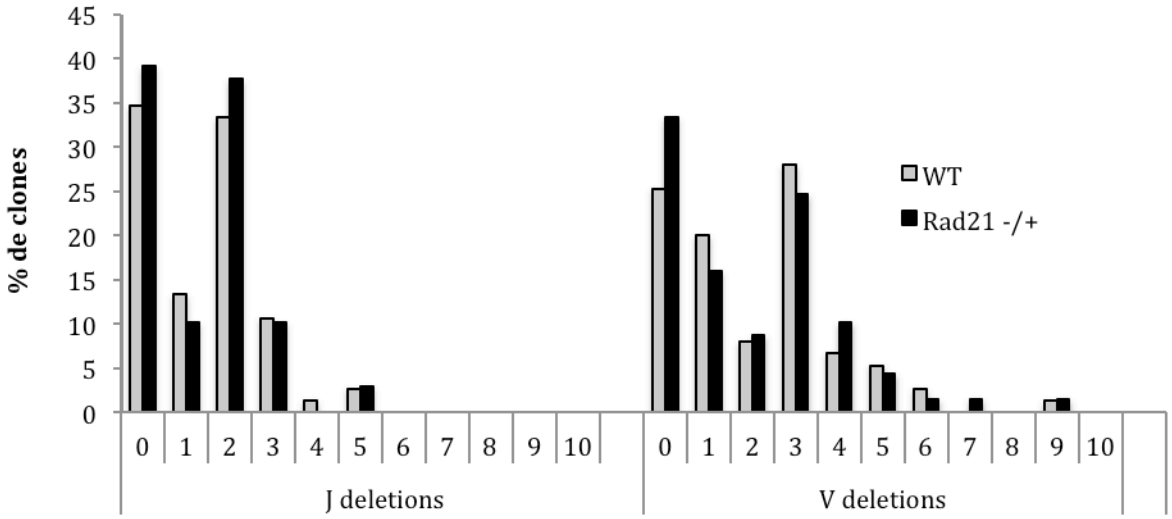
RAD21 et diversification des gènes des immunoglobulines

En raison de l'implication des cohésines dans la réparation des CDB, nous nous sommes intéressés à leurs rôles dans les mécanismes physiologiques nécessitant la génération et la réparation de CDB : la recombinaison V(D)J et la CSR. Les résultats préliminaires de l'étude de ces mécanismes sont présentés figures 15 et 16. L'inactivation de *Rad21* est létale à l'état embryonnaire, nous avons reçu trois souris hétérozygotes *Rad21+/-* de l'équipe australienne de l'équipe de McKay(Xu et al., 2010). Le phénotype radiosensible de ces souris est décrit dans l'article (Xu et al., 2010). Dans un premier temps, nous avons procédé à l'étude de la recombinaison V(D)J. Nous avons prélevé les cellules B de la moelle osseuse et évalué le nombre de cellules IgM+ : cellules ayant effectué une recombinaison V(D)J productive. Nous avons observé que le ratio cellules IgM+ / cellules IgM- était moins élevé dans la moelle issue des souris *Rad21+ /-*. Cependant, cette différence n'est pour l'instant, pas statistiquement significative. Nous avons également procédé à l'analyse des jonctions résultant de la recombinaison V/J de la chaîne légère κ. Si le taux de délétions observé est le même au sein des cellules B *Rad21+/-* et des cellules *wt*, le taux d'insertions est plus de deux fois supérieur au sein des cellules B *Rad21+/-*. Si ce résulat est confirmé il faudra se pencher sur le recrutement des polymérases spécialisées en absence de RAD21 lors de la réparation des CDB RAG dépendantes.

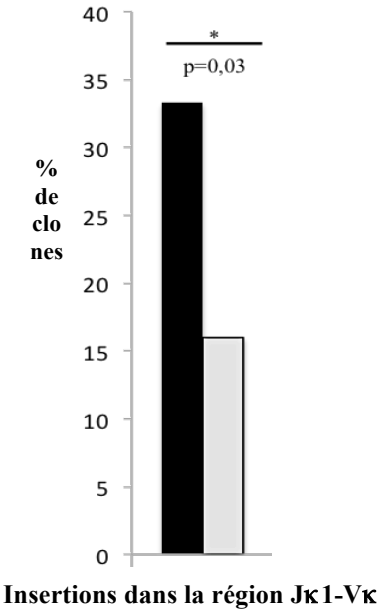
Afin d'étudier la CSR, nous avons mesuré par test Elisa la présence des différents isotypes dans le sérum des souris (figure 16). De manière intéressante, le taux d'IgG1 était nettement inférieur au sein de la circulation des trois souris *Rad21+ /-* et au contraire, le taux d'IgG2b était plus important. La recombinaison aboutissant à l'expression de l'IgG1 se déroule entre régions switch séparées de 95 kb et celle permettant l'expression d'IgG2b entre régions séparées de 185 kb. Dès lors nous pouvons proposer l'hypothèse que durant la CSR, le complexe de cohésion favorise la recombinaison Sμ-Sγ1 et inhibe la recombinaison Sμ-Sγ2b. Cette hypothèse se marie parfaitement avec le rôle insulateur du complexe lors de la répression transcriptionnelle et dans la formation d'une synapse lors de la V(D)J mais également avec le rôle décrit dans l'article 2 ; l'inhibition du EJ distal. Cependant les distances séparant les CDB dans nos substrats sont moindres comparées à celle séparant deux régions Switch. Nous souhaitons : (1) Etudier la CSR des autres souris reçues par test Elisa et stimulation du CSR (2) procéder à l'étude des jonctions switch afin d'évaluer la fidélité de la réparation et voir si nous retrouvons une altération du recrutement de 53BP1 aux CDB. Comme, les souris étudiées sont hétérozygotes, il se peut que le rôle du complexe dans la CSR soit largement sous-estimé. En parrallèle de l'étude *in vivo*, nous avons donc entrepris d'inactiver *Rad21* au sein de cellules B de souris pouvant effectuer la CSR vers différents isotypes après stimulation : les cellules murines CH12F3. Ces cellules ont été utilisées dans l'étude de la CSR en absence du complexe de cohésion (Thomas-Claudepierre et al., 2013). J'ai tenté d'inactiver par différents moyens l'expression de *Rad21* au sein des CH12F3 (Système Cre-Lox, CRISP et shARN). Sans succès. Finalement, en combinant l'inactivation de Rad21 avec celle de p53 nous avons pu obtenir très récemment des clones avec une

extinction durable et plus ou moins prononcée de *Rad21*. Avec ce modèle cellulaire, nous étudierons (1) la CSR vers différents isotypes et (2) les jonctions de réparation. En 2012, des mutations de RAD21 furent identifiées chez des patients atteints du syndrome de Cornelia de Lange. Il est à noter que pour le moment, aucun déficit immunitaire n'a été reporté chez ses patients.

(a)



(b)

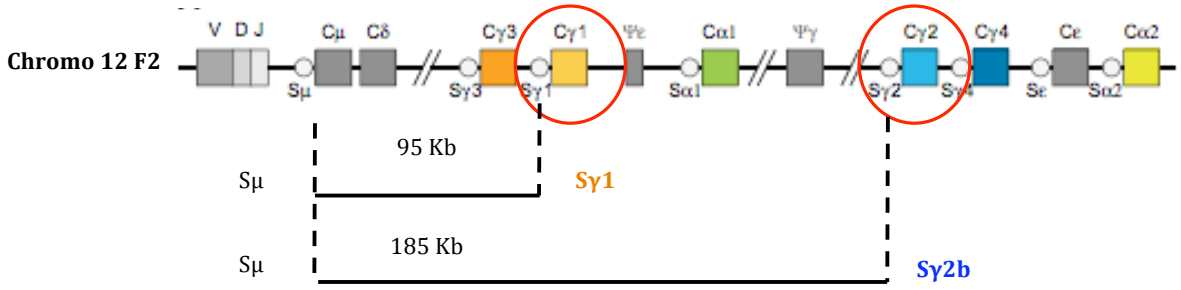


<u>Figure 19 :</u> Analyse des jonctions issues de la recombinaison VJ de la chaîne légère κ.

(a) Etude des délétions aux jonctions Jκ1-Vκ résultant de la recombinaison VJ de la chaîne légère κ. L'étude des jonctions a été effectuée chez trois souris hétérozygotes *Rad21+ /-*

(b) Analyse des insertions aux jonctions Jκ1-Vκ résultant de la recombinaison VJ de la chaîne légère κ. Le taux global d'insertions est représenté ; regroupant les N-et les P-additions. Analyse statistique par test de Student

(a)



(b)

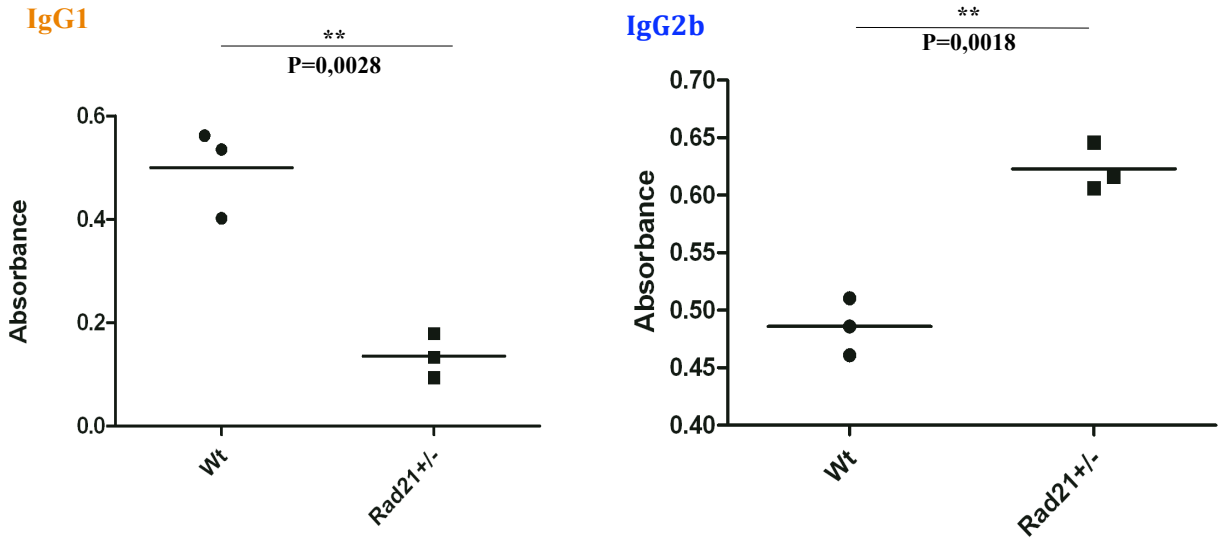


Figure 20: Etude préliminaire de la CSR

(a) Représentation du locus IgH murin avant la CSR, la distance séparant deux régions switch est représentée.

(b) Taux d'isotypes IgG1 et IgG2b mesuré au sein des trois souris hétérozygotes par test élisa. Les autres isotypes étant présents en même quantité, les résultats du test Elisa ne sont pas représentés.

Conclusions

Au cours de la réplication, la réparation des cassures double brin (CDB) par recombinaison homologue (RH), basée sur la synthèse d'ADN à partir de la chromatide sœur, permet le maintien de la stabilité du génome. La religature d'extrémités (EJ) éloignées de CDB peut quant à elle génèrer des réarrangements menaçant son intégrité. Nous avons étudié le mécanisme de réparation par EJ en fonction d'un nouveau facteur : la distance séparant deux cassures double brin. En utilisant des substrats intrachromosomiques permettant la mesure de l'efficacité et de la fidélité du EJ après ligature d'extrémités séparées par 3200 pb ou 34 pb, nous avons mis en évidence 1/L'implication du complexe de cohésion dans l'inhibition du EJ d'extrémités distales et 2/ une efficacité et d'une fidélité différentielle du EJ en fonction de la distance séparant deux CDB.

Le complexe de cohésion joue un rôle central dans l'interface réplication/réparation, la cohésion des chromatides sœurs permet la proximité physique de la chromatide sœur et favorise donc la réparation par RH. Nous démontrons dans cette étude que le complexe de cohésion permet également l'inhibition spécifique du EJ d'extrémités éloignées, probablement en limitant la mobilité de la chromatine endommagée et la formation d'une synapse propice au rapprochement des extrémités. Le complexe de cohésion étant crucial dans l'inhibition des réarrangements complexes tels que les translocations et insertions, il est un acteur essentiel de la stabilité génomique.

La religature d'extrémités éloignées nécessite la formation d'une synapse permettant le rapprochement des extrémités à liguer. Nous avons démontré que la réparation par EJ d'extrémités distales impliquait plus de délétions et de réarrangements aux jonctions de réparation (insertions complexes). Nous avons décrit deux machineries de résection et de protection des extrémités différentes, agissant en fonction de la distance séparant les extrémités à liguer soulignant l'importance de la balance 53BP1/RIF1 *versus* CtIP dans la protection contre les réarrangements complexes aux jonctions de réparation. Ce résultat nous amène à l'étude de l'implication d'autres acteurs (DNA-PK, XRCC4/XLF..) dans la protection ou la résection d'extrémités issues de CDB proches ou éloignées.

Table des illustrations

Figure 1 : La signalisation par ATM et modifications chromatiniennes
Figure 2 : Recombinaison homologue (RH)
Figure 3 : Réparation d'une cassure double brin (CDB) par C-NHEJ ou A-EJ.
Figure 4 : Réarrangement du locus IgH et structure du BCR fonctionnel.
Figure 5 : Mécanisme de la recombinaison V(D)J, coupure enzymatique par le complexe RAG et schéma du séquence RSS.
Figure 6 : Réarrangement du locus *IgH* : Hypermutation somatique (SHM) et Commutation de classe (CSR).
Figure 7: La Commutation de classe ou CSR (Class Switch recombination)
Figure 8 : Régulation de la résection : 53BP1 et BRCA1.
Figure 9 : Réarrangements chromosomiques, translocations et chromothripsis
Figure 10 : Le complexe de cohésion durant le cycle cellulaire d'une cellule de mammifère.
Figure 11 : Les rôles multiples du complexe de cohésion
Figure 12: Altération du recrutement de 53BP1 en absence de RAD21
Figure 13 : Analyse des jonctions de réparation d'extrémités distales (3200 pb) après déplétion combinée de 53BP1 et RAD21
Figure 14 : Modèle de réparation par EJ en fonction de la distance séparant deux CDB
Figure 15 : Résultats préliminaires : L'EJ distal est inhibé en présence d'un faible stress réplicatif chronique.
Figure 16 : Analyse des jonctions de réparation d'extrémités proximales (34 pb) après déplétion combinée de 53BP1 et RAD21
Figure 17 : L'absence de RAD21 conduit à la formation de fusions télomériques entre chromatides sœurs et à la formation de TIFs (Telomere dysfunction induced foci)
Figure 18 : Le rôle de SA1dans la cohésion et la réplication télomérique est essentiel pour la bonne ségrégation chromosomique et dans la prévention de l'aneuploïdie.
Figure 19 : Analyse des jonctions issues de la recombinaison VJ de la chaîne légère κ.
Figure 20 : Etude préliminaire de la CSR

Bibliographie

Adamo, A., Collis, S. J., Adelman, C. A., Silva, N., Horejsi, Z., Ward, J. D., … La Volpe, A. (2010). Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia. *Molecular Cell*, *39*, 25–35. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.026

Ahel, I., Rass, U., El-Khamisy, S. F., Katyal, S., Clements, P. M., McKinnon, P. J., … West, S. C. (2006). The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*, *443*, 713–716. doi:10.1038/nature05164

Ahmad, A., Robinson, A. R., Duensing, A., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Weisberg, D. B., … Niedernhofer, L. J. (2008). ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(16), 5082–92. doi:10.1128/MCB.00293-08

Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, *124*, 301–313. doi:10.1016/j.cell.2005.12.031

Akopiants, K., Zhou, R.-Z., Mohapatra, S., Valerie, K., Lees-Miller, S. P., Lee, K.-J., … Povirk, L. F. (2009). Requirement for XLF/Cernunnos in alignment-based gap filling by DNA polymerases lambda and mu for nonhomologous end joining in human whole-cell extracts. *Nucleic Acids Research*, *37*(12), 4055–62. doi:10.1093/nar/gkp283

Almouzni, G., & Probst, A. V. (2011). Heterochromatin maintenance and establishment: lessons from the mouse pericentromere. *Nucleus (Austin, Tex.)*, *2*(5), 332–8. doi:10.4161/nucl.2.5.17707

Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.-C., & Reynaud, C.-A. (2008). Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*, 1357–1368. doi:10.1084/jem.20070950

Ariumi, Y., Masutani, M., Copeland, T. D., Mimori, T., Sugimura, T., Shimotohno, K., … Noda, M. (1999). Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene*, *18*(32), 4616–25. doi:10.1038/sj.onc.1202823

Aten, J. a, Stap, J., Krawczyk, P. M., van Oven, C. H., Hoebe, R. A., Essers, J., & Kanaar, R. (2004). Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5654), 92–5. doi:10.1126/science.1088845

Audebert, M., Salles, B., & Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(53), 55117–26. doi:10.1074/jbc.M404524200

Audebert, M., Salles, B., Weinfeld, M., & Calsou, P. (2006). Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. *Journal of Molecular Biology*, *356*(2), 257–65. doi:10.1016/j.jmb.2005.11.028

Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C. K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., … Legube, G. (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology*, *21*(4), 366–74. doi:10.1038/nsmb.2796

Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, *421*(6922), 499–506. doi:10.1038/nature01368

Barber, T. D., McManus, K., Yuen, K. W. Y., Reis, M., Parmigiani, G., Shen, D., … Hieter, P. (2008). Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 3443–3448. doi:10.1073/pnas.0712384105

Barlow, J. H., Faryabi, R. B., Callén, E., Wong, N., Malhowski, A., Chen, H. T., … Nussenzweig, A. (2013). Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell*, *152*, 620–632. doi:10.1016/j.cell.2013.01.006

Beck, B. D., Lee, S. S., Williamson, E., Hromas, R. A., & Lee, S. H. (2011). Biochemical characterization of metnases endonuclease activity and its role in NHEJ repair. *Biochemistry*, *50*, 4360–4370. doi:10.1021/bi200333k

Becker, A., Durante, M., Taucher-Scholz, G., & Jakob, B. (2014). ATM Alters the Otherwise Robust Chromatin Mobility at Sites of DNA Double-Strand Breaks (DSBs) in Human Cells. *PloS One*, *9*(3), e92640. doi:10.1371/journal.pone.0092640

Benedict, C. L., Gilfillan, S., Thai, T. H., & Kearney, J. F. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunological Reviews*, *175*, 150–157.

Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., & Stark, J. M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genetics*, *4*. doi:10.1371/journal.pgen.1000110

Bennett, C. B., Lewis, A. L., Baldwin, K. K., & Resnick, M. A. (1993). Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*, 5613–5617. doi:10.1073/pnas.90.12.5613

Berger, M. F., Hodis, E., Heffernan, T. P., Deribe, Y. L., Lawrence, M. S., Protopopov, A., … Garraway, L. A. (2012). Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature*. doi:10.1038/nature11071

Berkovich, E., Monnat, R. J., & Kastan, M. B. (2007). Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nature Cell Biology*, *9*, 683–690. doi:10.1038/ncb1599

Bernstein, N. K., Williams, R. S., Rakovszky, M. L., Cui, D., Green, R., Karimi-Busheri, F., … Glover, J. N. M. (2005). The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase. *Molecular Cell*, *17*, 657–670. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.012

Bétermier, M., Bertrand, P., & Lopez, B. S. (2014). Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? *PLoS Genetics*, *10*(1), e1004086. doi:10.1371/journal.pgen.1004086

Bharti, S. K., Khan, I., Banerjee, T., Sommers, J. a, Wu, Y., & Brosh, R. M. (2014). Molecular functions and cellular roles of the ChlR1 (DDX11) helicase defective in the rare cohesinopathy Warsaw breakage syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *71*(14), 2625–39. doi:10.1007/s00018-014-1569-4

Bickmore, W. A., & Teague, P. (2002). Influences of chromosome size, gene density and nuclear position on the frequency of constitutional translocations in the human population. *Chromosome Research*, *10*, 707–715. doi:10.1023/A:1021589031769

Boboila, C., Alt, F. W., & Schwer, B. (2012). *Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. Advances in immunology* (1st ed., Vol. 116, pp. 1–49). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-394300-2.00001-6

Boboila, C., Jankovic, M., Yan, C. T., Wang, J. H., Wesemann, D. R., Zhang, T., … Alt, F. W. (2013). Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(14), 3034–3039. doi:10.1073/pnas.1302919110

Boboila, C., Oksenych, V., Gostissa, M., Wang, J. H., Zha, S., Zhang, Y., … Schwer, B. (2012). Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(7), 2473–8. doi:10.1073/pnas.1121470109

Boboila, C., Yan, C., Wesemann, D. R., Jankovic, M., Wang, J. H., Manis, J., … Alt, F. W. (2010). Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(2), 417–27. doi:10.1084/jem.20092449

Borchert, G. M., Holton, N. W., & Larson, E. D. (2011). Repression of human activation induced cytidine deaminase by miR-93 and miR-155. *BMC Cancer*, *11*, 347. doi:10.1186/1471-2407-11-347

Bothmer, A., Robbiani, D. F., Di Virgilio, M., Bunting, S. F., Klein, I. a, Feldhahn, N., … Nussenzweig, M. C. (2011). Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Molecular Cell*, *42*(3), 319–29. doi:10.1016/j.molcel.2011.03.019

Bothmer, A., Robbiani, D. F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A., & Nussenzweig, M. C. (2010). 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(4), 855–65. doi:10.1084/jem.20100244

Boubakour-Azzouz, I., Bertrand, P., Claes, A., Lopez, B. S., & Rougeon, F. (2012). Terminal deoxynucleotidyl transferase requires KU80 and XRCC4 to promote N-addition at non-V(D)J chromosomal breaks in non-lymphoid cells. *Nucleic Acids Research*, *40*(17), 8381–91. doi:10.1093/nar/gks585

Boulton, S. J., & Jackson, S. P. (1996). Identification of a Saccharomyces cerevisiae Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Research*, *24*(23), 4639–4648. doi:10.1093/nar/24.23.4639

Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J. M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., … Jonkers, J. (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*, 688–695. doi:10.1038/nsmb.1831

Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondanèche, M.-C., Sanal, O., … Revy, P. (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, *124*(2), 287–99. doi:10.1016/j.cell.2005.12.030

Bunting, S. F., Callén, E., Wong, N., Chen, H. T., Polato, F., Gunn, A., … Nussenzweig, A. (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, *141*, 243–254. doi:10.1016/j.cell.2010.03.012

Bunting, S. F., & Nussenzweig, A. (2013). End-joining, translocations and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *13*(7), 443–54. doi:10.1038/nrc3537

Caldecott, K. W. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*, *2*(9), 955–969. doi:10.1016/S1568-7864(03)00118-6

Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews. Genetics*, *9*(8), 619–31. doi:10.1038/nrg2380

Callebaut, I., Malivert, L., Fischer, A., Mornon, J.-P., Revy, P., & de Villartay, J.-P. (2006). Cernunnos interacts with the XRCC4 x DNA-ligase IV complex and is homologous to the yeast nonhomologous end-joining factor Nej1. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(20), 13857–60. doi:10.1074/jbc.C500473200

Callen, E., Di Virgilio, M., Kruhlak, M. J., Nieto-Soler, M., Wong, N., Chen, H.-T., … Nussenzweig, A. (2013). 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell*, *153*(6), 1266–80. doi:10.1016/j.cell.2013.05.023

Cancer, T., & Atlas, G. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, *487*, 330–7. doi:10.1038/nature11252

Canudas, S., & Smith, S. (2009). Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *The Journal of Cell Biology*, *187*, 165–173. doi:10.1083/jcb.200903096

Caron, P., Aymard, F., Iacovoni, J. S., Briois, S., Canitrot, Y., Bugler, B., … Legube, G. (2012). Cohesin protects genes against GH2AX induced by DNA double-strand breaks. *PLoS Genetics*, *8*. doi:10.1371/journal.pgen.1002460

Carr, A. M., & Lambert, S. (2013). Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination. *Journal of Molecular Biology*, *425*(23), 4733–44. doi:10.1016/j.jmb.2013.04.023

Carr, A. M., Paek, A. L., & Weinert, T. (2011). DNA replication: failures and inverted fusions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *22*(8), 866–74. doi:10.1016/j.semcdb.2011.10.008

Cary, R. B., Peterson, S. R., Wang, J., Bear, D. G., Bradbury, E. M., & Chen, D. J. (1997). DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(9), 4267–4272. doi:10.1073/pnas.94.9.4267

Celli, G. B., Denchi, E. L., & de Lange, T. (2006). Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nature Cell Biology*, *8*, 885–890. doi:10.1038/ncb1444

Cesare, A. J., Hayashi, M. T., Crabbe, L., & Karlseder, J. (2013). Supplemental Information The Telomere Deprotection Response Is Functionally Distinct from the Genomic DNA Damage Response Anthony. *Molecular Cell*, *51*(2), 1–12. doi:10.1016/j.molcel.2013.06.006

Chan, D. W., Chen, B. P.-C., Prithivirajsingh, S., Kurimasa, A., Story, M. D., Qin, J., & Chen, D. J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes & Development*, *16*, 2333–2338. doi:10.1101/gad.1015202

Chan, D. W., & Lees-Miller, S. P. (1996). The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*, 8936–8941. doi:10.1074/jbc.271.15.8936

Chan, S. H., Yu, A. M., & McVey, M. (2010). Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in Drosophila. *PLoS Genetics*, *6*(7), e1001005. doi:10.1371/journal.pgen.1001005

Chapman, J. R., Barral, P., Vannier, J. B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., … Boulton, S. J. (2013). RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Molecular Cell*, *49*, 858–871. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.002

Chapman, J. R., Sossick, A. J., Boulton, S. J., & Jackson, S. P. (2012). BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair. *Journal of Cell Science*. doi:10.1242/jcs.105353

Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., & Boulton, S. J. (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.029

Chaudhuri, J., & Alt, F. W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nature Reviews. Immunology*, *4*(7), 541–52. doi:10.1038/nri1395

Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., … Alt, F. W. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Advances in Immunology*, *94*, 157–214. doi:10.1016/S0065-2776(06)94006-1

Chaudhuri, J., Khuong, C., & Alt, F. W. (2004). Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature*, *430*(7003), 992–8. doi:10.1038/nature02821

Chaumeil, J., Micsinai, M., Ntziachristos, P., Roth, D. B., Aifantis, I., Kluger, Y., … Skok, J. a. (2013). The RAG2 C-terminus and ATM protect genome integrity by controlling antigen receptor gene cleavage. *Nature Communications*, *4*, 2231. doi:10.1038/ncomms3231

Chen, B. P. C., Uematsu, N., Kobayashi, J., Lerenthal, Y., Krempler, A., Yajima, H., … Chen, D. J. (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*, 6582–6587. doi:10.1074/jbc.M611605200

Chen, Y., & Poon, R. Y. C. (2008). The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, *13*, 5016–5029. doi:3060 [pii]

Cheng, Q., Barboule, N., Frit, P., Gomez, D., Bombarde, O., Couderc, B., … Calsou, P. (2011). Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, *39*(22), 9605–19. doi:10.1093/nar/gkr656

Chiang, C., Jacobsen, J. C., Ernst, C., Hanscom, C., Heilbut, A., Blumenthal, I., … Talkowski, M. E. (2012). Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nature Genetics*. doi:10.1038/ng.2202

Chiarle, R., Zhang, Y., Frock, R. L., Lewis, S. M., Molinie, B., Ho, Y.-J., … Alt, F. W. (2011). Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell*, *147*(1), 107–19. doi:10.1016/j.cell.2011.07.049

Chistiakov, D. A., Voronova, N. V, & Chistiakov, A. P. (2009). Ligase IV syndrome. *European Journal of Medical Genetics*, *52*(6), 373–8. doi:10.1016/j.ejmg.2009.05.009

Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell*, *40*(2), 179–204. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019

Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(8), 616–27. doi:10.1038/nrm2450

Coop, G., Wen, X., Ober, C., Pritchard, J. K., & Przeworski, M. (2008). High-resolution mapping of crossovers reveals extensive variation in fine-scale recombination patterns among humans. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5868), 1395–8. doi:10.1126/science.1151851

Cooper, M. P., Machwe, A., Orren, D. K., Brosh, R. M., Ramsden, D., & Bohr, V. A. (2000). Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes & Development*, *14*, 907–912. doi:10.1101/gad.14.8.907

Corneo, B., Wendland, R. L., Deriano, L., Cui, X., Klein, I. a, Wong, S.-Y., … Roth, D. B. (2007). Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature*, *449*(7161), 483–6. doi:10.1038/nature06168

Cortizas, E. M., Zahn, A., Hajjar, M. E., Patenaude, A.-M., Di Noia, J. M., & Verdun, R. E. (2013). Alternative End-Joining and Classical Nonhomologous End-Joining Pathways Repair Different Types of Double-Strand Breaks during Class-Switch Recombination. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. doi:10.4049/jimmunol.1301300

Costantini, S., Woodbine, L., Andreoli, L., Jeggo, P. A., & Vindigni, A. (2007). Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair*, *6*(6), 712–22. doi:10.1016/j.dnarep.2006.12.007

Cotner-Gohara, E., Kim, I.-K., Hammel, M., Tainer, J. A., Tomkinson, A. E., & Ellenberger, T. (2010). Human DNA ligase III recognizes DNA ends by dynamic switching between two DNA-bound states. *Biochemistry*, *49*(29), 6165–76. doi:10.1021/bi100503w

Courbet, S., Gay, S., Arnoult, N., Wronka, G., Anglana, M., Brison, O., & Debatisse, M. (2008). Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature*, *455*(7212), 557–60. doi:10.1038/nature07233

Cremer, T., & Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews. Genetics*, *2*, 292–301. doi:10.1038/35066075

Daley, J. M., & Wilson, T. E. (2005). Rejoining of DNA double-strand breaks as a function of overhang length. *Molecular and Cellular Biology*, *25*, 896–906. doi:10.1128/MCB.25.3.896-906.2005

Davis, A. J., Chen, B. P. C., & Chen, D. J. (2014). DNA-PK: A dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair*, *17*, 21–29. doi:10.1016/j.dnarep.2014.02.020

Davis, A. J., & Chen, D. J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cacer Res*, *2*(3), 130–143. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02.DNA

De Massy, B. (2013). Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, *47*, 563–99. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155423

De Piccoli, G., Cortes-Ledesma, F., Ira, G., Torres-Rosell, J., Uhle, S., Farmer, S., … Aragón, L. (2006). Smc5-Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination. *Nature Cell Biology*, *8*(9), 1032–4. doi:10.1038/ncb1466

De Villartay, J.-P. (2009). V(D)J recombination deficiencies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *650*(D), 46–58. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19731800

Decottignies, A. (2013). Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective. *Frontiers in Genetics*, *4*, 48. doi:10.3389/fgene.2013.00048

Degner, S. C., Verma-gaur, J., Wong, T. P., Bossen, C., Iverson, G. M., & Torkamani, A. (2011). CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the Igh locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(23), 9566–9571. doi:10.1073/pnas.1019391108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1019391108

Della-Maria, J., Zhou, Y., Tsai, M.-S., Kuhnlein, J., Carney, J. P., Paull, T. T., & Tomkinson, A. E. (2011). Human Mre11/human Rad50/Nbs1 and DNA ligase IIIalpha/XRCC1 protein complexes act together in an alternative nonhomologous end joining pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(39), 33845–53. doi:10.1074/jbc.M111.274159

Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H., & Lieberman, P. M. (2009). TERRA RNA Binding to TRF2 Facilitates Heterochromatin Formation and ORC Recruitment at Telomeres. *Molecular Cell*, *35*, 403–413. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.025

Deng, Z., Wang, Z., Stong, N., Plasschaert, R., Moczan, A., Chen, H.-S., … Lieberman, P. M. (2012). A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *The EMBO Journal*, *31*(21), 4165–78. doi:10.1038/emboj.2012.266

Deriano, L., Chaumeil, J., Coussens, M., Multani, A., Chou, Y., Alekseyenko, A. V, … Roth, D. B. (2011). The RAG2 C terminus suppresses genomic instability and lymphomagenesis. *Nature*, *471*(7336), 119–23. doi:10.1038/nature09755

Deriano, L., & Roth, D. B. (2013). Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annual Review of Genetics*, *47*, 433–55. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155540

Deriano, L., Stracker, T. H., Baker, A., Petrini, J. H. J., & Roth, D. B. (2006). Roles for NBS1 in alternative nonhomologous end-joining of V(D)J recombination intermediates. *Molecular Cell*, *34*(D), 13–25. doi:10.1016/j.molcel.2009.03.009

Deshpande, R. A., Williams, G. J., Limbo, O., Williams, R. S., Kuhnlein, J., Lee, J., … Paull, T. T. (2014). ATP-driven Rad 50 conformations regulate DNA tethering , end resection , and ATM checkpoint signaling. *EMBO J*, *33*(5), 482–500. doi:10.1002/embj.201386100

Desiderio, S. V, Yancopoulos, G. D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M. A., Landau, N., … Baltimore, D. (1984). Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature*, *311*(5988), 752–5. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6092963

Di Noia, J., & Neuberger, M. S. (2002). Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature*, *419*(6902), 43–8. doi:10.1038/nature00981

Di Virgilio, M., Callen, E., Yamane, A., Zhang, W., Jankovic, M., Gitlin, A. D., … Nussenzweig, M. C. (2013). Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science (New York, N.Y.)*, *339*, 711–5. doi:10.1126/science.1230624

Difilippantonio, M. J., Petersen, S., Chen, H. T., Johnson, R., Jasin, M., Kanaar, R., … Nussenzweig, A. (2002). Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *The Journal of Experimental Medicine*, *196*, 469–480. doi:10.1084/jem.20020851

Difilippantonio, S., Gapud, E., Wong, N., Huang, C.-Y., Mahowald, G., Chen, H. T., … Nussenzweig, A. (2008). 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. *Nature*, *456*(7221), 529–33. doi:10.1038/nature07476

Dimitrova, N., Chen, Y.-C. M., Spector, D. L., & de Lange, T. (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature*, *456*(7221), 524–8. doi:10.1038/nature07433

Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B. D., & Gasser, S. M. (2012). Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nature Cell Biology*, *14*(5), 502–509. doi:10.1038/ncb2465

Dion, V., Kalck, V., Seeber, A., Schleker, T., & Gasser, S. M. (2013). Cohesin and the nucleolus constrain the mobility of spontaneous repair foci. *EMBO Reports*, *14*(11), 984–91. doi:10.1038/embor.2013.142

Doherty, A. J., Jackson, S. P., & Weller, G. R. (2001). Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins [2]. *FEBS Letters*. doi:10.1016/S0014-5793(01)02589-3

Donate, L. E., & Blasco, M. A. (2011). Telomeres in cancer and ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *366*, 76–84. doi:10.1098/rstb.2010.0291

Douglas, P., Gupta, S., Morrice, N., Meek, K., & Lees-Miller, S. P. (2005). DNA-PK-dependent phosphorylation of Ku70/80 is not required for non-homologous end joining. *DNA Repair*, *4*(9), 1006–18. doi:10.1016/j.dnarep.2005.05.003

Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., … Côté, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Molecular Cell*, *16*, 979–990. doi:10.1016/j.molcel.2004.12.003

Durkin, S. G., & Glover, T. W. (2007). Chromosome fragile sites. *Annual Review of Genetics*, *41*, 169–92. doi:10.1146/annurev.genet.41.042007.165900

Ege, M., Ma, Y., Manfras, B., Kalwak, K., Lu, H., Lieber, M. R., … Pannicke, U. (2005). Omenn syndrome due to ARTEMIS mutations. *Blood*, *105*(11), 4179–86. doi:10.1182/blood-2004-12-4861

Enervald, E., Du, L., Visnes, T., Bjorkman, A., Lindgren, E., Wincent, J., … Pan-Hammarstrom, Q. (2013). A regulatory role for the cohesin loader NIPBL in nonhomologous end joining during immunoglobulin class switch recombination. *Journal of Experimental Medicine*. doi:10.1084/jem.20130168

Escribano-Diaz, C., & Durocher, D. (2013). DNA repair pathway choice--a PTIP of the hat to 53BP1. *EMBO Reports*, *14*(8), 665–6. doi:10.1038/embor.2013.99

Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J. T. F., Tkáč, J., … Durocher, D. (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Molecular Cell*, *49*(5), 872–83. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.001

Falck, J., Coates, J., & Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, *434*(7033), 605–11. doi:10.1038/nature03442

Falck, J., Petrini, J. H. J., Williams, B. R., Lukas, J., & Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nature Genetics*, *30*(3), 290–4. doi:10.1038/ng845

Farber-Katz, S. E., Dippold, H. C., Buschman, M. D., Peterman, M. C., Xing, M., Noakes, C. J., … Field, S. J. (2014). DNA damage triggers golgi dispersal via DNA-PK and GOLPH3. *Cell*, *156*, 413–427. doi:10.1016/j.cell.2013.12.023

Farina, A., Shin, J.-H., Kim, D.-H., Bermudez, V. P., Kelman, Z., Seo, Y.-S., & Hurwitz, J. (2008). Studies with the human cohesin establishment factor, ChlR1. Association of ChlR1 with Ctf18-RFC and Fen1. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(30), 20925–36. doi:10.1074/jbc.M802696200

Fattah, F., Lee, E. H., Weisensel, N., Wang, Y., Lichter, N., & Hendrickson, E. A. (2010). Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells. *PLoS Genetics*, *6*, e1000855. doi:10.1371/journal.pgen.1000855

Feng, L., Fong, K. W., Wang, J., Wang, W., & Chen, J. (2013). RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*, 11135–11143. doi:10.1074/jbc.M113.457440

Foiani, M., & Bartek, J. (2014). Golgi feels DNA's pain. *Cell*, *156*(3), 392–3. doi:10.1016/j.cell.2014.01.030

Forment, J. V, Kaidi, A., & Jackson, S. P. (2012). Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nature Reviews. Cancer*, *12*(10), 663–70. doi:10.1038/nrc3352

Frappart, P.-O., & McKinnon, P. J. (2008). Mouse models of DNA double-strand break repair and neurological disease. *DNA Repair*, *7*, 1051–1060. doi:10.1016/j.dnarep.2008.03.007

Frit, P., Barboule, N., Yuan, Y., Gomez, D., & Calsou, P. (2014). Alternative end-joining pathway(s): Bricolage at DNA breaks. *DNA Repair*, *17*, 81–97. doi:10.1016/j.dnarep.2014.02.007

Gandhi, M., Evdokimova, V. N., T.Cuenco, K., Nikiforova, M. N., Kelly, L. M., Stringer, J. R., … Nikiforov, Y. E. (2012). Homologous chromosomes make contact at the sites of double-strand breaks in genes in somatic G0/G1-phase human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1205759109

Gaymes, T. J., North, P. S., Brady, N., Hickson, I. D., Mufti, G. J., & Rassool, F. V. (2002). Increased error-prone non homologous DNA end-joining--a proposed mechanism of chromosomal instability in Bloom's syndrome. *Oncogene*, *21*, 2525–2533. doi:10.1038/sj.onc.1205331

Gehlen, L. R., Gasser, S. M., & Dion, V. (2011). How Broken DNA Finds Its Template for Repair: A Computational Approach. *Progress of Theoretical Physics Supplement*, *191*(0), 20–29. doi:10.1143/PTPS.191.20

Gell, D., & Jackson, S. P. (1999). Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Research*, *27*, 3494–3502. doi:10.1093/nar/27.17.3494

Giardino, D., Corti, C., Ballarati, L., Colombo, D., Sala, E., Villa, N., … Dalpra, L. (2009). De novo balanced chromosome rearrangements in prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, *29*, 257–265. doi:10.1002/pd.2215

Gibson, B. a, & Kraus, W. L. (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *13*(7), 411–24. doi:10.1038/nrm3376

Giunta, S., & Jackson, S. P. (2011). Give me a break, but not in mitosis: The mitotic DNA damage response marks DNA double-strand breaks with early signaling events. *Cell Cycle*, *10*(8), 1215–1221. doi:10.4161/cc.10.8.15334

Gong, Z., Cho, Y.-W., Kim, J.-E., Ge, K., & Chen, J. (2009). Accumulation of Pax2 transactivation domain interaction protein (PTIP) at sites of DNA breaks via RNF8-dependent pathway is required for cell survival after DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(11), 7284–93. doi:10.1074/jbc.M809158200

Goodarzi, A. A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S. A., Ye, R., … Lees-Miller, S. P. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *The EMBO Journal*, *25*, 3880–3889. doi:10.1038/sj.emboj.7601255

Göttlich, B., Reichenberger, S., Feldmann, E., & Pfeiffer, P. (1998). Rejoining of DNA double-strand breaks in vitro by single-strand annealing. *European Journal of Biochemistry*, *258*(2), 387–395. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2580387.x

Gottlieb, T. M., & Jackson, S. P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, *72*, 131–142. doi:10.1016/0092-8674(93)90057-W

Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-barbat, J., & Lopez, B. S. (2012). Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice be- tween homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *American Journal of Cancer Research*, *2*(3), 249–268. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365807/\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365807/pdf/ajcr0002-0249.pdf

Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., … Lopez, B. S. (2013). A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell Reports*, *5*(1), 21–8. doi:10.1016/j.celrep.2013.08.034

Gravel, S., Chapman, J. R., Magill, C., & Jackson, S. P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes & Development*, *22*(20), 2767–72. doi:10.1101/gad.503108

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., & Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, *388*, 492–495. doi:10.1038/41358

Grundy, G. J., Moulding, H. a, Caldecott, K. W., & Rulten, S. L. (2014). One ring to bring them all-The role of Ku in mammalian non-homologous end joining. *DNA Repair*, *17*, 30–8. doi:10.1016/j.dnarep.2014.02.019

Grundy, G. J., Rulten, S. L., Zeng, Z., Arribas-Bosacoma, R., Iles, N., Manley, K., … Caldecott, K. W. (2013). APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes. *The EMBO Journal*, *32*, 112–25. doi:10.1038/emboj.2012.304

Guillou, E., Ibarra, A., Coulon, V., Casado-Vela, J., Rico, D., Casal, I., … Méndez, J. (2010). Cohesin organizes chromatin loops at DNA replication factories. *Genes & Development*, *24*(24), 2812–22. doi:10.1101/gad.608210

Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., & Lopez, B. S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Molecular Cell*, *14*, 611–623. doi:10.1016/j.molcel.2004.05.008

Hakim, O., Resch, W., Yamane, A., Klein, I., Kieffer-Kwon, K.-R., Jankovic, M., … Casellas, R. (2012). DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes. *Nature*. doi:10.1038/nature10909

Hammarsten, O., & Chu, G. (1998). DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*, 525–530.

Han, L., Mao, W., & Yu, K. (2012). X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1) deficiency enhances class switch recombination and is permissive for alternative end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(12), 4604–8. doi:10.1073/pnas.1120743109

Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell*, *28*(5), 739–45. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.015

Hayashi, M. T., Cesare, A. J., Fitzpatrick, J. a J., Lazzerini-Denchi, E., & Karlseder, J. (2012). A telomere-dependent DNA damage checkpoint induced by prolonged mitotic arrest. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(4), 387–94. doi:10.1038/nsmb.2245

Heacock, M., Spangler, E., Riha, K., Puizina, J., & Shippen, D. E. (2004). Molecular analysis of telomere fusions in Arabidopsis: multiple pathways for chromosome end-joining. *The EMBO Journal*, *23*(11), 2304–13. doi:10.1038/sj.emboj.7600236

Heidinger-Pauli, J. M., Unal, E., Guacci, V., & Koshland, D. (2008). The kleisin subunit of cohesin dictates damage-induced cohesion. *Molecular Cell*, *31*(1), 47–56. doi:10.1016/j.molcel.2008.06.005

Helmink, B. a, & Sleckman, B. P. (2012). The response to and repair of RAG-mediated DNA double-strand breaks. *Annual Review of Immunology*, *30*, 175–202. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101320

Helmrich, A., Ballarino, M., & Tora, L. (2011). Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Molecular Cell*, *44*(6), 966–77. doi:10.1016/j.molcel.2011.10.013

Hlatky, L. (2012). Double-strand break motions shift radiation risk notions? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(2), 351–2. doi:10.1073/pnas.1118927109

Hochegger, H., Dejsuphong, D., Fukushima, T., Morrison, C., Sonoda, E., Schreiber, V., … Takeda, S. (2006). Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. *The EMBO Journal*, *25*(6), 1305–14. doi:10.1038/sj.emboj.7601015

Honjo, T., Kinoshita, K., & Muramatsu, M. (2002). Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annual Review of Immunology*, *20*, 165–96. doi:10.1146/annurev.immunol.20.090501.112049

Huertas, P. (2010). DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(1), 11–6. doi:10.1038/nsmb.1710

Huertas, P., & Jackson, S. P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*, 9558–9565. doi:10.1074/jbc.M808906200

Huong, L. T., Kobayashi, M., Nakata, M., Shioi, G., Miyachi, H., Honjo, T., & Nagaoka, H. (2013). In vivo analysis of Aicda gene regulation: a critical balance between upstream enhancers and intronic silencers governs appropriate expression. *PloS One*, *8*(4), e61433. doi:10.1371/journal.pone.0061433

Iles, N., Rulten, S., El-Khamisy, S. F., & Caldecott, K. W. (2007). APLF (C2orf13) is a novel human protein involved in the cellular response to chromosomal DNA strand breaks. *Molecular and Cellular Biology*, *27*, 3793–3803. doi:10.1128/MCB.02269-06

Imai, K., Slupphaug, G., Lee, W.-I., Revy, P., Nonoyama, S., Catalan, N., … Durandy, A. (2003). Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nature Immunology*, *4*(10), 1023–8. doi:10.1038/ni974

Jakob, B., Splinter, J., Conrad, S., Voss, K. O., Zink, D., Durante, M., … Taucher-Scholz, G. (2011). DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Research*, *39*, 6489–6499. doi:10.1093/nar/gkr230

Jakob, B., Splinter, J., Durante, M., & Taucher-Scholz, G. (2009). Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*, 3172–3177. doi:10.1073/pnas.0810987106

Jeevan-Raj, B. P., Robert, I., Heyer, V., Page, A., Wang, J. H., Cammas, F., … Reina-San-Martin, B. (2011). Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(8), 1649–60. doi:10.1084/jem.20110118

Jiang, G., Plo, I., Wang, T., Rahman, M., Cho, J. H., Yang, E., … Xia, F. (2013). BRCA1-Ku80 protein interaction enhances end-joining fidelity of chromosomal double-strand breaks in the G1 phase of the cell cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(13), 8966–76. doi:10.1074/jbc.M112.412650

Johnson, K., Chaumeil, J., Micsinai, M., Wang, J. M. H., Ramsey, L. B., Baracho, G. V, … Skok, J. A. (2012). IL-7 functionally segregates the pro-B cell stage by regulating transcription of recombination mediators across cell cycle. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *188*(12), 6084–92. doi:10.4049/jimmunol.1200368

Jones, M. J. K., & Jallepalli, P. V. (2012). Chromothripsis: chromosomes in crisis. *Developmental Cell*, *23*(5), 908–17. doi:10.1016/j.devcel.2012.10.010

Kabotyanski, E. B., Gomelsky, L., Han, J. O., Stamato, T. D., & Roth, D. B. (1998). Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Research*, *26*(23), 5333–42. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=147996&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. a, van Berkum, N. L., … Young, R. a. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, *467*(7314), 430–5. doi:10.1038/nature09380

Kaidi, A., & Jackson, S. P. (2013). KAT5 tyrosine phosphorylation couples chromatin sensing to ATM signalling. *Nature*, *498*(7452), 70–4. doi:10.1038/nature12201

Kaneko, Y. S., Watanabe, N., Morisaki, H., Akita, H., Fujimoto, A., Tominaga, K., … Nakanishi, M. (1999). Cell-cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene*, *18*, 3673–3681. doi:10.1038/sj.onc.1202706

Kanno, S., Kuzuoka, H., Sasao, S., Hong, Z., Lan, L., Nakajima, S., & Yasui, A. (2007). A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses. *The EMBO Journal*, *26*(8), 2094–103. doi:10.1038/sj.emboj.7601663

Kannouche, P. L., Wing, J., & Lehmann, A. R. (2004). Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Molecular Cell*, *14*, 491–500. doi:S109727650400259X [pii]

Kim, J.-A., Kruhlak, M., Dotiwala, F., Nussenzweig, A., & Haber, J. E. (2007). Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals. *The Journal of Cell Biology*, *178*, 209–218. doi:10.1083/jcb.200612031

Kim, S.-T., Xu, B., & Kastan, M. B. (2002). Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes & Development*, *16*, 560–570. doi:10.1101/gad.970602

Klein, I. A., Resch, W., Jankovic, M., Oliveira, T., Yamane, A., Nakahashi, H., … Nussenzweig, M. C. (2011). Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell*, *147*(1), 95–106. doi:10.1016/j.cell.2011.07.048

Kloosterman, W. P., Tavakoli-Yaraki, M., Van Roosmalen, M. J., Van Binsbergen, E., Renkens, I., Duran, K., … Cuppen, E. (2012). Constitutional Chromothripsis Rearrangements Involve Clustered Double-Stranded DNA Breaks and Nonhomologous Repair Mechanisms. *Cell Reports*, *1*, 648–655. doi:10.1016/j.celrep.2012.05.009

Kon, A., Shih, L.-Y., Minamino, M., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nagata, Y., … Ogawa, S. (2013). Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nature Genetics*, *45*(August), 1–8. doi:10.1038/ng.2731

Koole, W., van Schendel, R., Karambelas, A. E., van Heteren, J. T., Okihara, K. L., & Tijsterman, M. (2014). A Polymerase Theta-dependent repair pathway suppresses extensive genomic instability at endogenous G4 DNA sites. *Nature Communications*, *5*, 3216. doi:10.1038/ncomms4216

Krawczyk, P. M., Borovski, T., Stap, J., Cijsouw, T., ten Cate, R., Medema, J. P., … Aten, J. a. (2012). Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Science*, *125*(Pt 9), 2127–33. doi:10.1242/jcs.089847

Kruhlak, M. J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W. G., McNally, J. G., … Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *The Journal of Cell Biology*, *172*(6), 823–34. doi:10.1083/jcb.200510015

Kruhlak, M. J., Celeste, A., & Nussenzweig, A. (2006). Spatio-Temporal Dynamics of Chromatin Containing DNA Breaks Extra View ND ES SC CE RIB. *Cell Cycle*, (September), 1910–1912.

Kuo, T., & Schlissel, M. (2009). Mechanisms controlling expression of the RAG locus during lymphocyte development. *Current Opinion in Immunology*, *21*(2), 173–178. doi:10.1016/j.coi.2009.03.008.Mechanisms

Kurimasa, A., Kumano, S., Boubnov, N. V, Story, M. D., Tung, C. S., Peterson, S. R., & Chen, D. J. (1999). Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Molecular and Cellular Biology*, *19*, 3877–3884.

Leber, R., Wise, T. W., Mizuta, R., & Meek, K. (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*, 1794–1801. doi:10.1074/jbc.273.3.1794

Lee, B.-S., Gapud, E. J., Zhang, S., Dorsett, Y., Bredemeyer, A., George, R., … Sleckman, B. P. (2013). Functional intersection of ATM and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in coding end joining during V(D)J recombination. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(18), 3568–79. doi:10.1128/MCB.00308-13

Lee, D.-H., Acharya, S. S., Kwon, M., Drane, P., Guan, Y., Adelmant, G., … Chowdhury, D. (2014). Dephosphorylation Enables the Recruitment of 53BP1 to Double-Strand DNA Breaks. *Molecular Cell*, 1–14. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.020

Lee, J.-H., & Paull, T. T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5667), 93–6. doi:10.1126/science.1091496

Lee, K., & Lee, S. E. (2007). Saccharomyces cerevisiae Sae2- and Tel1-dependent single-strand DNA formation at DNA break promotes microhomology-mediated end joining. *Genetics*, *176*(4), 2003–14. doi:10.1534/genetics.107.076539

Lee-Theilen, M., Matthews, A. J., Dierdre, K., Zheng, S., & Chaudhuri, J. (2012). CtIP promotes microhomology-mediated alternative end-joining during class switch recombination. *Nature Structure Molecular Biology*, *18*(1), 75–79. doi:10.1038/nsmb.1942.CtIP

Lees-Miller, S. P., Godbout, R., Chan, D. W., Weinfeld, M., Day, R. S., Barron, G. M., & Allalunis-Turner, J. (1995). Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science (New York, N.Y.)*, *267*, 1183–1185. doi:10.1126/science.7855602

Li, G., Alt, F. W., Cheng, H.-L., Brush, J. W., Goff, P. H., Murphy, M. M., … Zha, S. (2008). Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination. *Molecular Cell*, *31*(5), 631–40. doi:10.1016/j.molcel.2008.07.017

Li, Z., Dordai, D. I., Lee, J., & Desiderio, S. (1996). A conserved degradation signal regulates RAG-2 accumulation during cell division and links V(D)J recombination to the cell cycle. *Immunity*, *5*(6), 575–89. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8986717

Liang, F., Romanienko, P. J., Weaver, D. T., Jeggo, P. A., & Jasin, M. (1996). Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(17), 8929–33. Retrieved from

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38571&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
Liang, L., Deng, L., Chen, Y., Li, G. C., Shao, C., & Tischfield, J. A. (2005). Modulation of DNA end joining by nuclear proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(36), 31442–9. doi:10.1074/jbc.M503776200
Liang, L., Deng, L., Nguyen, S. C., Zhao, X., Maulion, C. D., Shao, C., & Tischfield, J. A. (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, *36*(10), 3297–310. doi:10.1093/nar/gkn184
Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, *79*, 181–211. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131
Liu, P., Erez, A., Nagamani, S. C. S., Dhar, S. U., Ko, K. E., Dharmadhikari, A. V, … Hastings, P. J. (2012). Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell*, *146*(6), 889–903. doi:10.1016/j.cell.2011.07.042.Chromosome
Lottersberger, F., Bothmer, A., Robbiani, D. F., Nussenzweig, M. C., & de Lange, T. (2013). Role of 53BP1 oligomerization in regulating double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(6), 2146–51. doi:10.1073/pnas.1222617110
Luo, H., Li, Y., Mu, J.-J., Zhang, J., Tonaka, T., Hamamori, Y., … Qin, J. (2008). Regulation of intra-S phase checkpoint by ionizing radiation (IR)-dependent and IR-independent phosphorylation of SMC3. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*, 19176–19183. doi:10.1074/jbc.M802299200
Ma, J.-L., Kim, E. M., Haber, J. E., & Lee, S. E. (2003). Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Molecular and Cellular Biology*, *23*, 8820–8828. doi:10.1128/MCB.23.23.8820-8828.2003
Ma, Y., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2005). The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair*, *4*, 845–851. doi:10.1016/j.dnarep.2005.04.013
Maher, C. A., & Wilson, R. K. (2012). Chromothripsis and human disease: Piecing together the shattering process. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2012.01.006
Mari, P.-O., Florea, B. I., Persengiev, S. P., Verkaik, N. S., Brüggenwirth, H. T., Modesti, M., … van Gent, D. C. (2006). Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(49), 18597–602. doi:10.1073/pnas.0609061103
Massip, L., Caron, P., Iacovoni, J. S., Trouche, D., & Legube, G. (2010). Deciphering the chromatin landscape induced around DNA double strand breaks. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *9*, 2963–2972. doi:10.4161/cc.9.15.12412
Matthews, A. G. W., Kuo, A. J., Ramón-Maiques, S., Han, S., Champagne, K. S., Ivanov, D., … Oettinger, M. A. (2007). RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature*, *450*(7172), 1106–10. doi:10.1038/nature06431
Mazón, G., Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2010). SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell*, *142*(4), 646, 646.e1. doi:10.1016/j.cell.2010.08.006
McAleenan, A., Clemente-Blanco, A., Cordon-Preciado, V., Sen, N., Esteras, M., Jarmuz, A., & Aragón, L. (2013). Post-replicative repair involves separase-dependent removal of the kleisin subunit of cohesin. *Nature*, *493*(7431), 250–4. doi:10.1038/nature11630
McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W., & Weigert, M. (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(10), 3180–3184. doi:10.1073/pnas.81.10.3180
Meaburn, K. J., Misteli, T., & Soutoglou, E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Seminars in Cancer Biology*, *17*(1), 80–90. doi:10.1016/j.semcancer.2006.10.008

Merkle, D., Douglas, P., Moorhead, G. B. G., Leonenko, Z., Yu, Y., Cramb, D., … Lees-Miller, S. P. (2002). The DNA-dependent protein kinase interacts with DNA to form a protein - DNA complex that is disrupted by phosphorylation. *Biochemistry*, *41*, 12706–12714. doi:10.1021/bi0263558

Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, *455*(7214), 770–4. doi:10.1038/nature07312

Mimori, T., & Hardin, J. A. (1986). Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, *261*, 10375–10379.

Miné-Hattab, J., & Rothstein, R. (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nature Cell Biology*, *14*(5), 510–517. doi:10.1038/ncb2472

Misteli, T. (2007). Beyond the Sequence: Cellular Organization of Genome Function. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2007.01.028

Mitelman, F. (2000). Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. doi:10.1016/S1383-5742(00)00006-5

Mitelman, F., Johansson, B., & Mertens, F. (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Reviews. Cancer*, *7*, 233–245. doi:10.1038/nrc2091

Munoz, I. M., Jowsey, P. A., Toth, R., & Rouse, J. (2007). Phospho-epitope binding by the BRCT domains of hPTIP controls multiple aspects of the cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Research*, *35*, 5312–5322. doi:10.1093/nar/gkm493

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., & Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, *102*(5), 553–63. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007474

Musio, A., Montagna, C., Mariani, T., Tilenni, M., Focarelli, M. L., Brait, L., … Vezzoni, P. (2005). SMC1 involvement in fragile site expression. *Human Molecular Genetics*, *14*(4), 525–33. doi:10.1093/hmg/ddi049

Nagasawa, H., Little, J. B., Lin, Y.-F., So, S., Kurimasa, A., Peng, Y., … Chen, B. P. C. (2011). Differential role of DNA-PKcs phosphorylations and kinase activity in radiosensitivity and chromosomal instability. *Radiation Research*, *175*, 83–89. doi:10.1667/RR2092.1

Nelms, B. E., Maser, R. S., MacKay, J. F., Lagally, M. G., & Petrini, J. H. (1998). In Situ Visualization of DNA Double-Strand Break Repair in Human Fibroblasts. *Science*, *280*(5363), 590–592. doi:10.1126/science.280.5363.590

Nguyen, T. V., Riou, L., Aoufouchi, S., & Rosselli, F. (2014). Fanca deficiency reduces A/T transitions in somatic hypermutation and alters class switch recombination junctions in mouse B cells. *The Journal of Experimental Medicine*. doi:10.1084/jem.20131637

Nickoloff, J. A. (1992). Transcription enhances intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(12), 5311–8. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=360468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Nikiforov, Y. E., Koshoffer, A., Nikiforova, M., Stringer, J., & Fagin, J. A. (1999). Chromosomal breakpoint positions suggest a direct role for radiation in inducing illegitimate recombination between the ELE1 and RET genes in radiation-induced thyroid carcinomas. *Oncogene*, *18*, 6330–6334. doi:10.1038/sj.onc.1203019

Nimonkar, A. V, Ozsoy, A. Z., Genschel, J., Modrich, P., & Kowalczykowski, S. C. (2008). Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(44), 16906–11. doi:10.1073/pnas.0809380105

Ochi, T., Wu, Q., & Blundell, T. L. (2014). The spatial organization of non-homologous end joining: From bridging to end joining. *DNA Repair*, *17*, 98–109. doi:10.1016/j.dnarep.2014.02.010

Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., & Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science (New York, N.Y.)*, *248*(4962), 1517–23. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2360047

Oka, Y., Suzuki, K., Yamauchi, M., Mitsutake, N., & Yamashita, S. (2011). Recruitment of the cohesin loading factor NIPBL to DNA double-strand breaks depends on MDC1, RNF168 and

HP1γ in human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *411*(4), 762–7. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.021

Okamoto, K., Bartocci, C., Ouzounov, I., Diedrich, J. K., Yates, J. R., & Denchi, E. L. (2013). A two-step mechanism for TRF2-mediated chromosome-end protection. *Nature*, *494*, 502–5. doi:10.1038/nature11873

Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S. M., Canny, M. D., Brun, C. M., Strecker, J., … Durocher, D. (2014). Mitosis Inhibits DNA Double-Strand Break Repair to Guard Against Telomere Fusions. *Science (New York, N.Y.)*, *189*(March). doi:10.1126/science.1248024

Osborne, C. S., Chakalova, L., Mitchell, J. A., Horton, A., Wood, A. L., Bolland, D. J., … Fraser, P. (2007). Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biology*, *5*, 1763–1772. doi:10.1371/journal.pbio.0050192

Pace, P., Mosedale, G., Hodskinson, M. R., Rosado, I. V, Sivasubramaniam, M., & Patel, K. J. (2010). Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway. *Science (New York, N.Y.)*, *329*(5988), 219–23. doi:10.1126/science.1192277

Panier, S., & Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(1), 7–18. doi:10.1038/nrm3719

Panier, S., & Durocher, D. (2013). Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(10), 661–72. doi:10.1038/nrm3659

Panier, S., Ichijima, Y., Fradet-Turcotte, A., Leung, C. C. Y., Kaustov, L., Arrowsmith, C. H., & Durocher, D. (2012). Tandem protein interaction modules organize the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks. *Molecular Cell*, *47*(3), 383–95. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.045

Papavasiliou, F. N., & Schatz, D. G. (2002). Somatic Hypermutation of Immunoglobulin Genes. *Cell*, *109*(2), S35–S44. doi:10.1016/S0092-8674(02)00706-7

Parish, J. L., Rosa, J., Wang, X., Lahti, J. M., Doxsey, S. J., & Androphy, E. J. (2006). The DNA helicase ChlR1 is required for sister chromatid cohesion in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, *119*, 4857–4865. doi:10.1242/jcs.03262

Pasqualucci, L., Guglielmino, R., Houldsworth, J., Mohr, J., Aoufouchi, S., Polakiewicz, R., … Dalla-Favera, R. (2004). Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood*, *104*(10), 3318–25. doi:10.1182/blood-2004-04-1558

Patel, A. G., Sarkaria, J. N., & Kaufmann, S. H. (2011). Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*, 3406–3411. doi:10.1073/pnas.1013715108

Patenaude, A.-M., Orthwein, A., Hu, Y., Campo, V. A., Kavli, B., Buschiazzo, A., & Di Noia, J. M. (2009). Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(5), 517–27. doi:10.1038/nsmb.1598

Paul, K., Wang, M., Mladenov, E., Bencsik-Theilen, A., Bednar, T., Wu, W., … Iliakis, G. (2013). DNA ligases I and III cooperate in alternative non-homologous end-joining in vertebrates. *PloS One*, *8*(3), e59505. doi:10.1371/journal.pone.0059505

Pavri, R., & Nussenzweig, M. C. (2011). AID targeting in antibody diversity. *Advances in Immunology*, *110*, 1–26. doi:10.1016/B978-0-12-387663-8.00005-3

Peled, J. U., Kuang, F. L., Iglesias-Ussel, M. D., Roa, S., Kalis, S. L., Goodman, M. F., & Scharff, M. D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. *Annual Review of Immunology*, *26*, 481–511. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090236

Pellestor, F., Gatinois, V., Puechberty, J., & Geneviève, D. (2014). Le chromothripsis Une forme insoupçonnée extrême des remaniements, (Figure 1).

Peters, J.-M., Tedeschi, A., & Schmitz, J. (2008). The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes & Development*, *22*(22), 3089–114. doi:10.1101/gad.1724308

Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S., & Neuberger, M. S. (2002). AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*, *418*(6893), 99–103. doi:10.1038/nature00862

Piganeau, M., Ghezraoui, H., De Cian, A., Guittat, L., Tomishima, M., Perrouault, L., … Brunet, E. (2013). Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *Genome Research*, *23*(7), 1182–93. doi:10.1101/gr.147314.112

Polo, S. E., & Jackson, S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks : a focus on protein modifications. *Genes & Development*, *25*(5), 409–33. doi:10.1101/gad.2021311

Polo, S. E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y., & Jackson, S. P. (2010). Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *The EMBO Journal*, *29*, 3130–3139. doi:10.1038/emboj.2010.188

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., & Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry and Biology*. doi:10.1016/j.chembiol.2010.04.012

Pontier, D. B., & Tijsterman, M. (2009). A robust network of double-strand break repair pathways governs genome integrity during C. elegans development. *Current Biology : CB*, *19*(16), 1384–8. doi:10.1016/j.cub.2009.06.045

Postow, L. (2011). Destroying the ring: Freeing DNA from Ku with ubiquitin. *FEBS Letters*. doi:10.1016/j.febslet.2011.05.046

Postow, L., & Funabiki, H. (2013). An SCF complex containing Fbxl12 mediates DNA damage-induced Ku80 ubiquitylation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *12*, 587–95. doi:10.4161/cc.23408

Postow, L., Ghenoiu, C., Woo, E. M., Krutchinsky, A. N., Chait, B. T., & Funabiki, H. (2008). Ku80 removal from DNA through double strand break-induced ubiquitylation. *The Journal of Cell Biology*, *182*, 467–479. doi:10.1083/jcb.200802146

Potts, P. R., Porteus, M. H., & Yu, H. (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *The EMBO Journal*, *25*(14), 3377–88. doi:10.1038/sj.emboj.7601218

Povirk, L. F. (1996). DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutation Research*, *355*(1-2), 71–89. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781578

Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., & Lopez, B. S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(8), 819–24. doi:10.1038/nsmb.1641

Reddy, Y. V. R., Ding, Q., Lees-Miller, S. P., Meek, K., & Ramsden, D. A. (2004). Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*, 39408–39413. doi:10.1074/jbc.M406432200

Reina-San-Martin, B., Chen, J., Nussenzweig, A. A., & Nussenzweig, M. C. (2007). Enhanced intra-switch region recombination during immunoglobulin class switch recombination in 53BP1-/- B cells. *European Journal of Immunology*, *37*(1), 235–9. doi:10.1002/eji.200636789

Remeseiro, S., Cuadrado, A., Carretero, M., Martínez, P., Drosopoulos, W. C., Cañamero, M., … Losada, A. (2012). Cohesin-SA1 deficiency drives aneuploidy and tumourigenesis in mice due to impaired replication of telomeres. *The EMBO Journal*, *31*(9), 2076–89. doi:10.1038/emboj.2012.11

Revy, P., Malivert, L., & de Villartay, J.-P. (2006). Cernunnos-XLF, a recently identified non-homologous end-joining factor required for the development of the immune system. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, *6*(6), 416–20. doi:10.1097/01.all.0000246623.72365.43

Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., … Durandy, A. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*, *102*(5), 565–75. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007475

Reynaud, C.-A., Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., & Weill, J.-C. (2007). [Immunoglobulin gene hypermutation: when error becomes a quality]. *Médecine Sciences : M/S*, *23*(5), 470–2. doi:10.1051/medsci/2007235470

Reynaud, C.-A., Delbos, F., Faili, A., Guéranger, Q., Aoufouchi, S., & Weill, J.-C. (2009). Competitive repair pathways in immunoglobulin gene hypermutation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *364*(1517), 613–9. doi:10.1098/rstb.2008.0206

Ribes-Zamora, A., Indiviglio, S. M., Mihalek, I., Williams, C. L., & Bertuch, A. a. (2013). TRF2 interaction with Ku heterotetramerization interface gives insight into c-NHEJ prevention at human telomeres. *Cell Reports*, *5*(1), 194–206. doi:10.1016/j.celrep.2013.08.040

Rivera-Calzada, A., Maman, J. D., Maman, J. P., Spagnolo, L., Pearl, L. H., & Llorca, O. (2005). Three-dimensional structure and regulation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs). *Structure (London, England : 1993)*, *13*, 243–55. doi:10.1016/j.str.2004.12.006

Robert, I., Dantzer, F., & Reina-San-Martin, B. (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(5), 1047–56. doi:10.1084/jem.20082468

Roberts, S. A., Strande, N., Burkhalter, M. D., Strom, C., Havener, J. M., Hasty, P., & Ramsden, D. A. (2010). Ku is a 5 9 -dRP / AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature*, *464*(7292), 1214–1217. doi:10.1038/nature08926

Rocha, P. P., Micsinai, M., Kim, J. R., Hewitt, S. L., Souza, P. P., Trimarchi, T., … Skok, J. A. (2012). Close Proximity to Igh Is a Contributing Factor to AID-Mediated Translocations. *Molecular Cell*, *47*, 873–885. doi:10.1016/j.molcel.2012.06.036

Roerink, S. F., van Schendel, R., & Tijsterman, M. (2014). Polymerase theta-mediated end joining of replication-associated DNA breaks in C. elegans. *Genome Research*. doi:10.1101/gr.170431.113

Rogozin, I. B., & Diaz, M. (2004). Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *172*(6), 3382–4. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004135

Roix, J. J., McQueen, P. G., Munson, P. J., Parada, L. A., & Misteli, T. (2003). Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nature Genetics*, *34*, 287–291. doi:10.1038/ng1177

Ropars, V., Drevet, P., Legrand, P., Baconnais, S., Amram, J., Faure, G., … Charbonnier, J.-B. (2011). Structural characterization of filaments formed by human Xrcc4-Cernunnos/XLF complex involved in nonhomologous DNA end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(31), 12663–8. doi:10.1073/pnas.1100758108

Roukos, V., Burman, B., & Misteli, T. (2013). The cellular etiology of chromosome translocations. *Current Opinion in Cell Biology*. doi:10.1016/j.ceb.2013.02.015

Roukos, V., & Misteli, T. (2014). The biogenesis of chromosome translocations. *Nature Cell Biology*, *16*(4), 293–300. doi:10.1038/ncb2941

Roukos, V., Voss, T. C., Schmidt, C. K., Lee, S., Wangsa, D., & Misteli, T. (2013). Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6146), 660–4. doi:10.1126/science.1237150

Rush, J. S., Fugmann, S. D., & Schatz, D. G. (2004). Staggered AID-dependent DNA double strand breaks are the predominant DNA lesions targeted to S mu in Ig class switch recombination. *International Immunology*, *16*(4), 549–57. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039385

Saintigny, Y. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *The EMBO Journal*, *20*(14), 3861–3870. doi:10.1093/emboj/20.14.3861

Sartori, A. a, Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., … Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, *450*(7169), 509–14. doi:10.1038/nature06337

Schatz, D. G., & Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature Reviews. Immunology*, *11*(4), 251–63. doi:10.1038/nri2941

Seitan, V. C., Hao, B., Tachibana-Konwalski, K., Lavagnolli, T., Mira-Bontenbal, H., Brown, K. E., … Merkenschlager, M. (2011). A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature*, *476*(7361), 467–71. doi:10.1038/nature10312

Sfeir, A., & de Lange, T. (2012). Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science (New York, N.Y.)*, *336*(6081), 593–7. doi:10.1126/science.1218498

Shao, Z., Davis, A. J., Fattah, K. R., So, S., Sun, J., Lee, K.-J. J., … Chen, D. J. (2012). Persistently bound Ku at DNA ends attenuates DNA end resection and homologous recombination. *DNA Repair*, *11*(3), 310–6. doi:10.1016/j.dnarep.2011.12.007

Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., & Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & Development*, *14*, 289–300. doi:10.1101/gad.14.3.289

Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., & Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, *91*, 325–334. doi:10.1016/S0092-8674(00)80416-X

Shih, H.-Y., & Krangel, M. S. (2013). Chromatin architecture, CCCTC-binding factor, and V(D)J recombination: managing long-distance relationships at antigen receptor loci. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(10), 4915–21. doi:10.4049/jimmunol.1300218

Shih, H.-Y., Verma-Gaur, J., Torkamani, A., Feeney, A. J., Galjart, N., & Krangel, M. S. (2012). Tcra gene recombination is supported by a Tcra enhancer- and CTCF-dependent chromatin hub. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(50), E3493–502. doi:10.1073/pnas.1214131109

Silverman, J., Takai, H., Buonomo, S. B. C., Eisenhaber, F., & de Lange, T. (2004). Human Rif1, ortholog of a yeast telomeric protein, is regulated by ATM and 53BP1 and functions in the S-phase checkpoint. *Genes & Development*, *18*(17), 2108–19. doi:10.1101/gad.1216004

Simsek, D., Brunet, E., Wong, S. Y.-W. W., Katyal, S., Gao, Y., McKinnon, P. J., … Jasin, M. (2011). DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genetics*, *7*(6), e1002080. doi:10.1371/journal.pgen.1002080

Simsek, D., & Jasin, M. (2010). Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(4), 410–6. doi:10.1038/nsmb.1773

Singleton, B. K., Torres-Arzayus, M. I., Rottinghaus, S. T., Taccioli, G. E., & Jeggo, P. A. (1999). The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Molecular and Cellular Biology*, *19*, 3267–3277.

Sjögren, C., & Nasmyth, K. (2001). Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae. *Current Biology : CB*, *11*(12), 991–5. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448778

Smogorzewska, A., Karlseder, J., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., & De Lange, T. (2002). DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Current Biology*, *12*, 1635–1644. doi:10.1016/S0960-9822(02)01179-X

Snapper, C. M., Finkelman, F. D., & Paul, W. E. (1988). Regulation of IgG1 and IgE Production by Interleukin 4. *Immunological Reviews*, *102*(1), 51–75. doi:10.1111/j.1600-065X.1988.tb00741.x

Solier, S., Kohn, K. W., Scroggins, B., Xu, W., Trepel, J., Neckers, L., & Pommier, Y. (2012). From the Cover: Feature Article: Heat shock protein 90 (HSP90), a substrate and chaperone of DNA-PK necessary for the apoptotic response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1203617109

Solomon, D. A., Kim, T., Diaz-Martinez, L. A., Fair, J., Elkahloun, A. G., Harris, B. T., … Waldman, T. (2011). Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *333*, 1039–1043. doi:10.1158/1538-7445.AM2012-3114

Song, K., Jung, D., Jung, Y., Lee, S. G., & Lee, I. (2000). Interaction of human Ku70 with TRF2. In *FEBS Letters* (Vol. 481, pp. 81–85). doi:10.1016/S0014-5793(00)01958-X

Sonoda, E., Matsusaka, T., Morrison, C., Vagnarelli, P., Hoshi, O., Ushiki, T., … Takeda, S. (2001). Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Developmental Cell*, *1*(6), 759–70. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11740938

Soutoglou, E., Dorn, J. F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., … Misteli, T. (2007). Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, *9*(6), 675–82. doi:10.1038/ncb1591

Spagnolo, L., Rivera-Calzada, A., Pearl, L. H., & Llorca, O. (2006). Three-Dimensional Structure of the Human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 Complex Assembled on DNA and Its Implications for DNA DSB Repair. *Molecular Cell*, *22*, 511–519. doi:10.1016/j.molcel.2006.04.013

Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G. R., Mudie, L. J., … Campbell, P. J. (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, *144*, 27–40. doi:10.1016/j.cell.2010.11.055

Stephens, P. J., McBride, D. J., Lin, M.-L., Varela, I., Pleasance, E. D., Simpson, J. T., … Stratton, M. R. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*, *462*, 1005–1010. doi:10.1038/nature08645

Stephens, P. J., Tarpey, P. S., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D. C., … Ottestad, L. (2012). The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. doi:10.1038/nature11017

Ström, L., Lindroos, H. B., Shirahige, K., & Sj??gren, C. (2004). Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Molecular Cell*, *16*, 1003–1015. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.026

Ström, L., & Sjêgren, C. (2007). Chromosome segregation and double-strand break repair - a complex connection. *Current Opinion in Cell Biology*. doi:10.1016/j.ceb.2007.04.003

Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., & Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, *123*(7), 1213–26. doi:10.1016/j.cell.2005.09.038

Sturzenegger, A., Burdova, K., Kanagaraj, R., Levikova, M., Pinto, C., Cejka, P., & Janscak, P. (2014). DNA2 cooperates with the WRN and BLM RecQ helicases to mediate long-range DNA-end resection in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 0–23. doi:10.1074/jbc.M114.578823

Sun, J., Lee, K.-J., Davis, A. J., & Chen, D. J. (2012). Human Ku70/80 protein blocks exonuclease 1-mediated DNA resection in the presence of human Mre11 or Mre11/Rad50 protein complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(7), 4936–45. doi:10.1074/jbc.M111.306167

Suwa, A., Hirakata, M., Takeda, Y., Jesch, S. A., Mimori, T., & Hardin, J. A. (1994). DNA-dependent protein kinase (Ku protein-p350 complex) assembles on double-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*, 6904–6908. doi:10.1073/pnas.91.15.6904

Symington, L. S., & Gautier, J. (2011). Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. *Annual Review of Genetics*. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132435

Thomas-Claudepierre, A.-S., Schiavo, E., Heyer, V., Fournier, M., Page, A., Robert, I., & Reina-San-Martin, B. (2013). The cohesin complex regulates immunoglobulin class switch recombination. *Journal of Experimental Medicine*. doi:10.1084/jem.20130166

Thompson, E. R., Doyle, M. A., Ryland, G. L., Rowley, S. M., Choong, D. Y. H., Tothill, R. W., … Campbell, I. G. (2012). Exome Sequencing Identifies Rare Deleterious Mutations in DNA Repair Genes FANCC and BLM as Potential Breast Cancer Susceptibility Alleles. *PLoS Genetics*, *8*. doi:10.1371/journal.pgen.1002894

Tittel-Elmer, M., Lengronne, A., Davidson, M. B., Bacal, J., François, P., Hohl, M., … Cobb, J. a. (2012). Cohesin association to replication sites depends on rad50 and promotes fork restart. *Molecular Cell*, *48*(1), 98–108. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.004

Toulany, M., Lee, K.-J., Fattah, K. R., Lin, Y.-F., Fehrenbacher, B., Schaller, M., … Rodemann, H. P. (2012). Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Molecular Cancer Research : MCR*, *10*(7), 945–57. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0592

Touzot, F., Callebaut, I., Soulier, J., Gaillard, L., Azerrad, C., Durandy, A., … Revy, P. (2010). Function of Apollo (SNM1B) at telomere highlighted by a splice variant identified in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, *107*(22), 10097–102. doi:10.1073/pnas.0914918107

Truong, L. N., Li, Y., Shi, L. Z., Hwang, P. Y., He, J., Wang, H., … Wu, X. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(19), 7720–5. doi:10.1073/pnas.1213431110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1213431110

Tseng, H.-M., & Tomkinson, A. E. (2004). Processing and joining of DNA ends coordinated by interactions among Dnl4/Lif1, Pol4, and FEN-1. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(46), 47580–8. doi:10.1074/jbc.M404492200

Tubio, J. M. C., & Estivill, X. (2011). Cancer: When catastrophe strikes a cell. *Nature*, *470*(7335), 476–7. doi:10.1038/470476a

Unsal-Kaçmaz, K., & Sancar, A. (2004). Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities. *Molecular and Cellular Biology*, *24*, 1292–1300. doi:10.1128/MCB.24.3.1292-1300.2003

Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., & Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO Journal*, *22*(20), 5612–21. doi:10.1093/emboj/cdg541

Van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., & Gasser, S. M. (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell*, *119*, 777–788. doi:10.1016/j.cell.2004.11.033

Van der Lelij, P., Godthelp, B. C., van Zon, W., van Gosliga, D., Oostra, A. B., Steltenpool, J., … de Winter, J. P. (2009). The Cellular Phenotype of Roberts Syndrome Fibroblasts as Revealed by Ectopic Expression of ESCO2. *PLoS ONE*, *4*. doi:10.1371/journal.pone.0006936

Vera, G., Rivera-Munoz, P., Abramowski, V., Malivert, L., Lim, A., Bole-Feysot, C., … de Villartay, J.-P. (2013). Cernunnos deficiency reduces thymocyte life span and alters the T cell repertoire in mice and humans. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(4), 701–11. doi:10.1128/MCB.01057-12

Verkaik, N. S., Esveldt-van Lange, R. E. E., Van Heemst, D., Brüggenwirth, H. T., Hoeijmakers, J. H. J., Zdzienicka, M. Z., & Van Gent, D. C. (2002). Different types of V(D)J recombination and end-joining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells. *European Journal of Immunology*, *32*, 701–709. doi:10.1002/1521-4141(200203)32:3<701::AID-IMMU701>3.0.CO;2-T

Vilenchik, M. M., & Knudson, A. G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*, 12871–12876. doi:10.1073/pnas.2135498100

Walker, J. R., Corpina, R. A., & Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, *412*(6847), 607–14. doi:10.1038/35088000

Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., & Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Research*, *65*(10), 4020–30. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3055

Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., & Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Research*, *34*(21), 6170–82. doi:10.1093/nar/gkl840

Wang, X., Takenaka, K., & Takeda, S. (2010). PTIP promotes DNA double-strand break repair through homologous recombination. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 243–254. doi:10.1111/j.1365-2443.2009.01379.x

Wang, Y. (2008). Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chemical Research in Toxicology*, *21*, 276–281. doi:10.1021/tx700411g

Wang, Y., Ghosh, G., & Hendrickson, E. a. (2009). Ku86 represses lethal telomere deletion events in human somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(30), 12430–5. doi:10.1073/pnas.0903362106

Warburton, D. (1991). De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *American Journal of Human Genetics*, *49*, 995–1013.

Watrin, E., & Peters, J.-M. (2009). The cohesin complex is required for the DNA damage-induced G2/M checkpoint in mammalian cells. *The EMBO Journal*, *28*(17), 2625–35. doi:10.1038/emboj.2009.202

Weinert, T., Kaochar, S., Jones, H., Paek, a, & Clark, a J. (2009). The replication fork's five degrees of freedom, their failure and genome rearrangements. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*(6), 778–84. doi:10.1016/j.ceb.2009.10.004

Weinstock, D. M., Brunet, E., & Jasin, M. (2011). Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nature Cell Biology*, *9*(8), 978–981. doi:10.1038/ncb1624.Formation

Weinstock, D. M., Elliott, B., & Jasin, M. (2006). A model of oncogenic rearrangements: differences between chromosomal translocation mechanisms and simple double-strand break repair. *Blood*, *107*(2), 777–80. doi:10.1182/blood-2005-06-2437

West, R. B., Yaneva, M., & Lieber, M. R. (1998). Productive and nonproductive complexes of Ku and DNA-dependent protein kinase at DNA termini. *Molecular and Cellular Biology*, *18*, 5908–5920.

Weterings, E., & Van Gent, D. C. (2004). The mechanism of non-homologous end-joining: A synopsis of synapsis. *DNA Repair*. doi:10.1016/j.dnarep.2004.06.003

Williams, R. S., Moncalian, G., Williams, J. S., Yamada, Y., Limbo, O., Shin, D. S., … Tainer, J. A. (2008). Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair. *Cell*, *135*, 97–109. doi:10.1016/j.cell.2008.08.017

Winter, D. B., Sattar, N., Mai, J. J., & Gearhart, P. J. (1997). Insertion of 2 kb of bacteriophage DNA between an immunoglobulin promoter and leader exon stops somatic hypermutation in a kappa transgene. *Molecular Immunology*, *34*(5), 359–66. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293769

Wu, N., Kong, X., Ji, Z., Zeng, W., Potts, P. R., Yokomori, K., & Yu, H. (2012). Scc1 sumoylation by Mms21 promotes sister chromatid recombination through counteracting Wapl. *Genes & Development*, *26*(13), 1473–85. doi:10.1101/gad.193615.112

Wu, N., & Yu, H. (2012). The Smc complexes in DNA damage response. *Cell & Bioscience*, *2*(1), 5. doi:10.1186/2045-3701-2-5

Wu, Y., Sommers, J. a, Khan, I., de Winter, J. P., & Brosh, R. M. (2012). Biochemical characterization of Warsaw breakage syndrome helicase. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(2), 1007–21. doi:10.1074/jbc.M111.276022

Wyatt, M. D., & Pittman, D. L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chemical Research in Toxicology*, *19*(12), 1580–94. doi:10.1021/tx060164e

Xie, A., Kwok, A., & Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(8), 814–8. doi:10.1038/nsmb.1640

Xu, H., Balakrishnan, K., Malaterre, J., Beasley, M., Yan, Y., Essers, J., … McKay, M. J. (2010). Rad21-cohesin haploinsufficiency impedes DNA repair and enhances gastrointestinal radiosensitivity in mice. *PloS One*, *5*(8), e12112. doi:10.1371/journal.pone.0012112

Yajima, H., Lee, K.-J., & Chen, B. P. C. (2006). ATR-dependent phosphorylation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in response to UV-induced replication stress. *Molecular and Cellular Biology*, *26*, 7520–7528. doi:10.1128/MCB.00048-06

Yamtich, J., & Sweasy, J. B. (2010). DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1804*(5), 1136–50. doi:10.1016/j.bbapap.2009.07.008

Yan, C. T., Boboila, C., Souza, E. K., Franco, S., Hickernell, T. R., Murphy, M., … Alt, F. W. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*, *449*(7161), 478–82. doi:10.1038/nature06020

Yano, K., Morotomi-Yano, K., Wang, S.-Y., Uematsu, N., Lee, K.-J., Asaithamby, A., … Chen, D. J. (2008). Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. *EMBO Reports*, *9*(1), 91–6. doi:10.1038/sj.embor.7401137

Yazdi, P. T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Lee, E. Y.-H. P., & Qin, J. (2002). SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes & Development*, *16*, 571–582. doi:10.1101/gad.970702

You, Z., Shi, L. Z., Zhu, Q., Wu, P., Zhang, Y.-W., Basilio, A., … Hunter, T. (2009). CtIP links DNA double-strand break sensing to resection. *Molecular Cell*, *36*(6), 954–69. doi:10.1016/j.molcel.2009.12.002

Yu, X., & Chen, J. (2004). DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Molecular and Cellular Biology*, *24*, 9478–9486. doi:10.1128/MCB.24.21.9478-9486.2004

Yun, M. H., & Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*, *459*(7245), 460–3. doi:10.1038/nature07955

Zhang, S., Yajima, H., Huynh, H., Zheng, J., Callen, E., Chen, H.-T., … Chen, B. P. C. (2011). Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant mice associated with deficiencies in DNA repair. *The Journal of Cell Biology*, *193*, 295–305. doi:10.1083/jcb.201009074

Zhang, Y., McCord, R. P., Ho, Y. J., Lajoie, B. R., Hildebrand, D. G., Simon, A. C., … Dekker, J. (2012). Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations. *Cell*, *148*, 908–921. doi:10.1016/j.cell.2012.02.002

Zhou, Y., Caron, P., Legube, G., & Paull, T. T. (2014). Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Research*, *42*(3), e19. doi:10.1093/nar/gkt1309

Zhu, C., Mills, K. D., Ferguson, D. O., Lee, C., Manis, J., Fleming, J., … Alt, F. W. (2002). Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell*, *109*, 811–821. doi:10.1016/S0092-8674(02)00770-5

Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D. C., … Shiloh, Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nature Cell Biology*, *8*(8), 870–6. doi:10.1038/ncb1446

Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (New York, N.Y.)*, *300*, 1542–1548. doi:10.1126/science.1083430

The cohesin complex protects against genome rearrangement by preventing the end-joining of distal DNA double-strand-ends

Abstract :

DNA double-strand breaks (DSBs) repair is essential for genome stability/diversity, but can also generate genome rearrangements. Although non-homologous end-joining (NHEJ) is required for genome stability maintenance, the joining of distant double strand ends (DSE) should inexorably lead to genetic rearrangements.

We analyzed the efficiency and accurency of close or distal EJ repair. Our data show that global end-joining is more efficient on close ends (34bp) compared to distal ends (3200bp) and that C-NHEJ is favored on close ends, resulting in more accurate outcome, compared to distal ends where more mutagenic A-EJ events takes place. In addition, the joining of distal ends favors the insertion/capture of DNA sequences. Deletions are CtIP-dependent (and counteracted by 53BP1) on distal ends but not on close ends. Moreover, distance between the I-SceI sites favors CtIP-mediated complex rearranged insertions/capture of mosaic sequences from different chromosomes and 53BP1 and RIF1 protects against such complex events at the repair junction. These data show only few kb distances between two DSEs (which is very short to the nucleus scale) are sufficient to jeopardize DSB repair efficiency and accuracy, leading to complex scars at the re-sealed junctions, and cell response is sufficiently sensitive to differently process such distal ends.

We next addressed the question of the mechanisms preventing the joining of distant DSE. We show that depletion of the cohesin complex proteins specifically stimulates the end-joining of I-SceI-induced DSBs distant of 3200bp, while the joining of close DSEs (34bp) remained unaffected. Consistently, exome sequencing and cytogenetic analysis revealed that RAD21 ablation generates large chromosome rearrangements and a strong induction of replication stress-induced chromosome fusions. These data reveal a role for the cohesin complex in the protection against profound genome rearrangements arising through ligation of distant DSEs.